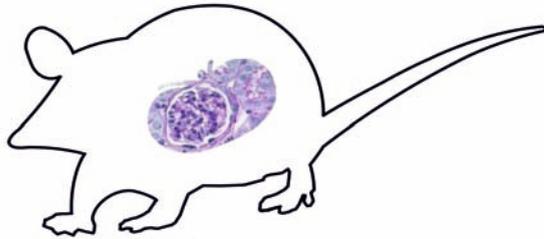


# TOXIN-VERMITTELTE ABLATION GLOMERULÄRER PARIETALER EPITHELZELLEN IM MAUSMODELL

---

**Eva-Maria Sicking**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und - Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger  
und  
dem Institut für Nephrologie und Immunologie  
der RWTH Aachen  
Betreuer: Prof. Dr. Marcus J. Moeller

## **TOXIN-VERMITTELTE ABLATION GLOMERULÄRER PARIETALER EPITHELZELLEN IM MAUSMODELL**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Eva-Maria Sicking**

Tierärztin aus Ahaus

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen:

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger  
Prof. Dr. Marcus J. Moeller

Tag der Disputation: 03.07.2014

Meiner Familie  
und dem weltbesten Christoph



Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden bereits veröffentlicht:

Sicking, Eva-Maria, Astrid Fuss, Sandra Uhlig, Peggy Jirak, Henry Dijkman, Jack Wetzels, Daniel R Engel, Torsten Urzyncok, Stefan Heidenreich, Wilhelm Kriz, Christian Kurts, Tammo Ostendorf, Jürgen Floege, Bart Smeets, and Marcus J Moeller (2012), "Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(4), 629–40.



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE NIERE.....	1
1.1.1	ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE.....	1
1.1.2	PARIETALZELASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN DER NIERE .....	14
1.2	DAS MAUSMODELL.....	23
1.2.1	DAS CRE/LOXP SYSTEM.....	23
1.2.2	DAS TET-ON SYSTEM .....	24
1.2.3	REPORTERGENE.....	26
1.2.4	DITPHHERIETOXIN.....	27
1.2.5	DAS MODELL: PEC-ABLATION DURCH SPEZIFISCHE EXPRESSION VON DTA.	28
1.3	ZIEL DER ARBEIT .....	31
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>32</b>
2.1	MATERIAL.....	32
2.1.1	VERSUCHSTIERE.....	32
2.1.2	GERÄTE.....	33
2.1.3	VERBRAUCHSMATERIAL.....	34
2.1.4	CHEMIKALIEN.....	35
2.1.5	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	37
2.1.6	ANTIKÖRPER.....	42
2.1.7	KOMMERZIELLE KITS.....	44
2.1.8	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER).....	45
2.1.9	ENZYME.....	46
2.1.10	NARKOTIKA .....	46
2.1.11	SOFTWARE.....	47
2.2	METHODEN.....	47
2.2.1	GENOTYPISIERUNG.....	47
2.2.2	INDUKTION DER TRANSGENEXPRESSION.....	50
2.2.3	URINGEWINNUNG UND -ANALYSE.....	50

2.2.4	ENTNAHME DER NIEREN.....	56
2.2.5	HISTOLOGISCHE AUFBEREITUNG FÜR DIE MIKROSKOPIE.....	56
2.2.6	GOLD-MARKIERTES BSA (BOVINES SERUM ALBUMIN).....	64
2.2.7	STATISTIK.....	64
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>65</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DES NIEREN-PHÄNOTYPS IM PARIETALZELL-ABLATIONS- MODELL.....	65
3.2	DIE PARTIELLE ABLATION DER GLOMERULÄREN PARIETALZELLEN KORRELIERT MIT EINER PROTEINURIE.....	74
3.3	AKTIVIERUNG VERBLEIBENDER PARIETALZELLEN DURCH PARTIELLE ABLATION .....	95
3.4	DIE AKTIVIERTEN PARIETALZELLEN PROLIFERIEREN UND BILDEN CHARAKTERISTISCHE ZELLULÄRE HALBMONDE.....	102
3.5	PEC-ABLATION IN EINEM TIERMODELL FÜR FSGS (THY 1.1).....	107
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>109</b>
4.1	FUNKTIONALITÄT DES MODELLS.....	109
4.2	ABLATION UND PROTEINURIE.....	112
4.3	AKTIVIERUNG DER PARIETALZELLEN.....	114
4.4	BILDUNG EINER TYPISCHEN HALBMONDNEPHRITIS.....	116
4.5	PARIETALZELLABLATION UND FSGS.....	118
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>132</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>134</b>

10	LITERATURVERZEICHNIS .....	136
11	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN .....	160
11.1	PAPER .....	160
11.2	FREIE VORTRÄGE.....	160
11.3	POSTER.....	161
12	ERKLÄRUNG .....	162
13	DANKSAGUNG .....	163



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DIE NIERE

### 1.1.1 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE

Die Niere (lat. *Ren*; griech. *Nephros*) ist ein paarig angelegtes Organ. Beim Menschen liegen die Nieren retroperitoneal auf beiden Seiten der Wirbelsäule in Höhe des 12. Brustwirbels bis 3. Lendenwirbels, wobei die rechte Niere ein wenig niedriger liegt als die linke. Eine humane Niere ist ca. 11-12 cm lang, 5-7 cm breit, 2,5-3 cm dick und umgeben von einer kollagenfaserhaltigen Kapsel (*Capsula fibrosa*) (Jennette and Heptinstall 2007).

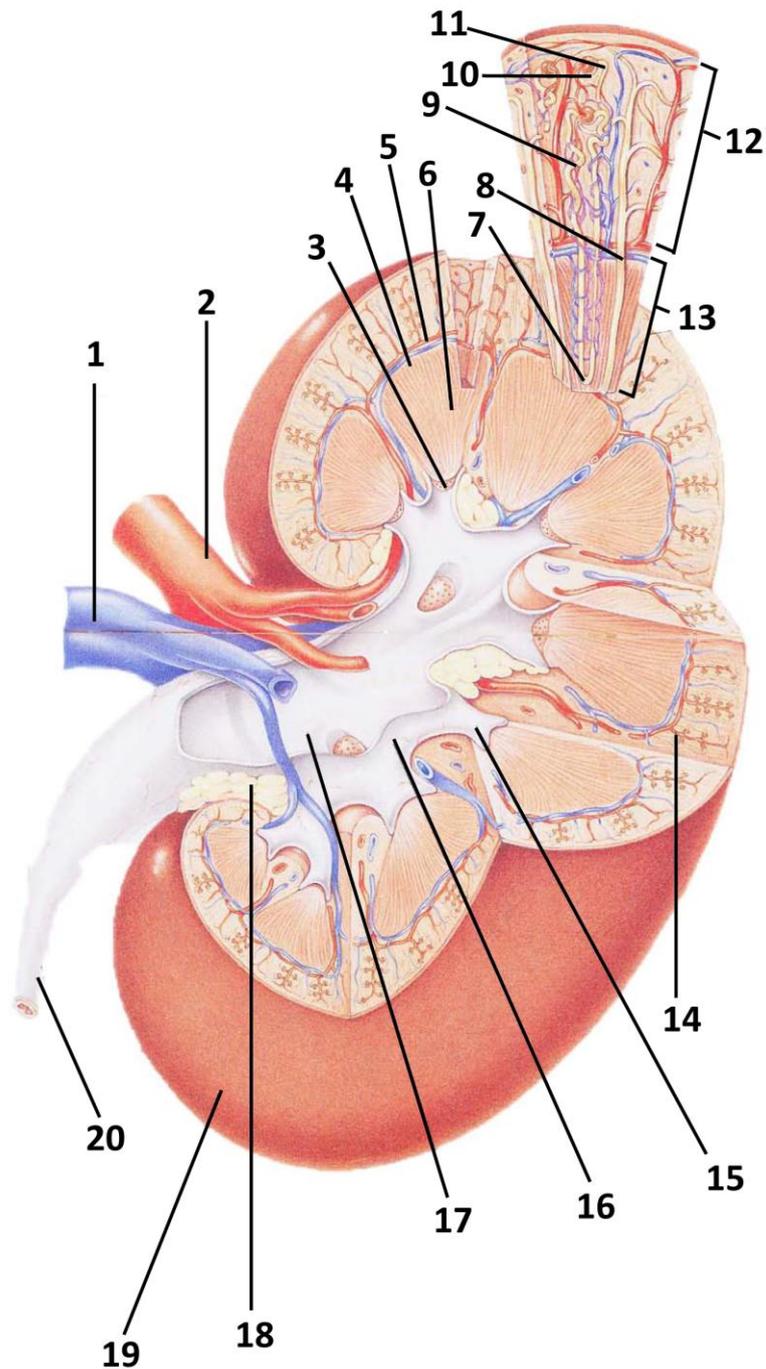
An der Medialkontur befindet sich eine Einziehung, der *Hilus renalis*, der zu einem inneren Hohlraum führt. Dieser beherbergt den Anfang des Harnleiters (*Ureter*), das Nierenbecken (*Pelvis renalis*), ein- und austretende Gefäße (*A. und V. renalis*) und Nerven.

Das Nierenparenchym lässt sich unterteilen in Mark (*Medulla renis*) und Rinde (*Cortex renis*). Im Mark befindet sich die *Papilla renalis*, die in kelchförmige Ausweitungen des Nierenbeckens hereinreicht (*Calices majores und minores renales*) (König and Liebich 2004).

Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus dem *Glomerulum*, dem proximalen Tubulus (*Tubulus contortus proximalis*), der Henle-Schleife (mit dem dünnen absteigenden, dem dünnen aufsteigenden und dem dicken aufsteigenden Ast; lat. *Ansa nephroni*) (Henle 1862), dem distalen Tubulus (*Tubulus contortus distalis*) und dem Sammelrohr (*Tubulus renalis colligens*) (Abb. 1.1, Nr.7-11). Man unterscheidet je nach Länge der Henle-Schleife juxtamedulläre und korticale Nephrone, wobei die juxtamedullären die längere Henle-Schleife haben (Gesamtzahl pro Niere: 2-2,5 Millionen) (Hees and Sinowatz 2006).

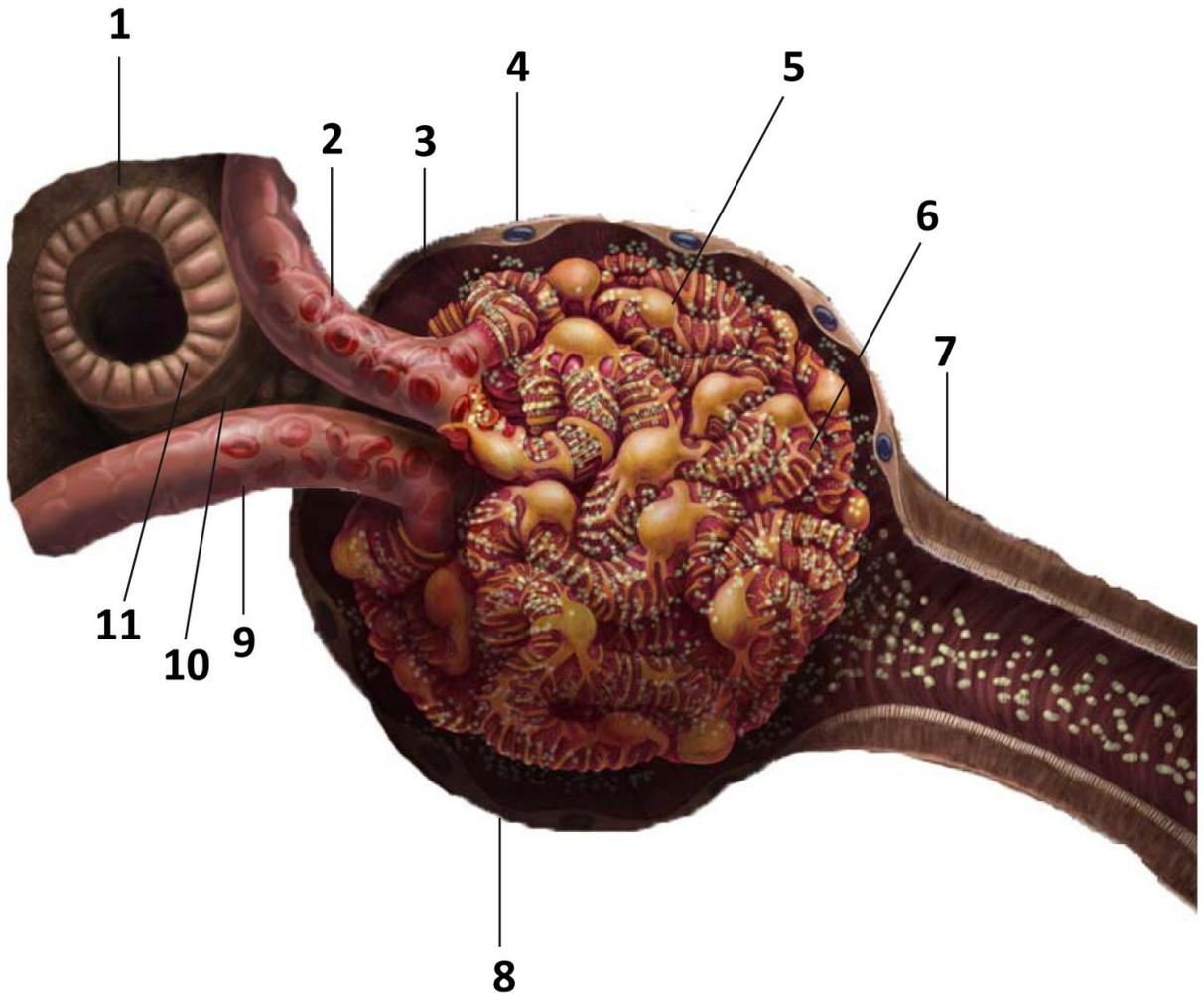
Für die Blutversorgung der Nieren entlässt die *Aorta abdominalis* auf beiden Seiten jeweils eine *A. renalis*. Diese teilt sich am Nieren-Hilus in mehrere *Aa. interlobares renis*, die den Grenzen der *Pyramides renales* bis in den Bereich der Nierenrinde folgen. Dort ziehen ihre Äste, die *Aa. arcuatae*, über die Pyramiden und entlassen *Aa. interlobulares*, welche die Rindenläppchen versorgen. Von diesen Arterien entspringen die *Vasa afferentia*, die das Kapillarknäuel der *Glomerula* bilden, wieder zu *Vasa efferentia* zusammenfinden und die *Glomerula* verlassen. Aus dem *Vas efferens* marknaher *Glomerula* ziehen *Arteriolae rectae* radiär ins Mark. Über Kapillaren fließt das Blut in *Venulae rectae* und weiter direkt in die *Vv. arcuatae*. Die *Vasa recta* sorgen für die ausreichende Blutversorgung des Nierenmarks. Die markferneren *Glomerula* entlassen ihr Blut über die *Vv. interlobulares*, die zu *Vv. arcuatae* werden. Diese entlassen wiederum *Vv. interlobares*, so dass das venöse Blut letztendlich durch die *V. renalis*, die am Hilus der Niere wieder austritt, in die *V. cava inferior* (oder beim Tier *V. cava caudalis*) abfließt (König and Liebich 2004).

Die renale Mikrozirkulation ist einzigartig. Die gesamte Nierendurchblutung beträgt ca. 1,2 l/min, das entspricht 20-25% des Herzminutenvolumens (HZV) (Klinke and Silbernagel 1994). Das bedeutet, dass ca.  $\frac{1}{4}$  des gesamten Blutvolumens, das pro Minute vom Herzen in den Blutkreislauf gepumpt wird, der Durchblutung der Nieren dient. Im Hinblick auf das geringe Gewicht der Nieren (ca. 0,4% des Körpergewichts) ist das eine sehr hohe Durchblutung, die vor allem der Ausscheidungsfunktion des Organs nützt. Wie in den 1980er Jahren durch verschiedene Indikatorstudien festgestellt werden konnte, ist die Blutverteilung auf Rinde und Mark sehr heterogen (Brenner et al. 1986a; Roman et al. 1991). Die Rinde ist mit ca. 700 ml Blut/min/100g am stärksten durchblutet, während die innere *Medulla* mit 100 ml/min/100g am wenigsten Blut enthält (Roman et al. 1991). Die Gesamtdurchblutung beider Nieren beläuft sich auf ca. 1700 l/d.



**Abb. 1.1: Anatomie der menschlichen Niere.** 1: *Vena renalis* 2: *Arteria renalis* 3: *Papilla renalis* 4: *Venae arcuatae* 5: *Arteriae arcuatae* 6: *Pyramides renales* 7: Henle-Schleife 8: Sammelrohr 9: distales Tubuluskonvolut 10: *Glomerulum* 11: proximales Tubuluskonvolut 12: *Cortex renis* 13: *Medulla renis* 14: *Aa. und Vv. interlobulares* 15: *Calices minores renales* 16: *Calices majores renales* 17: *Pelvis renalis* 18: Fettgewebe 19: *Capsula fibrosa* 20: Ureter (Abb. nach (Baggaley 2002)).

## 1.1.1.1 DAS GLOMERULUM

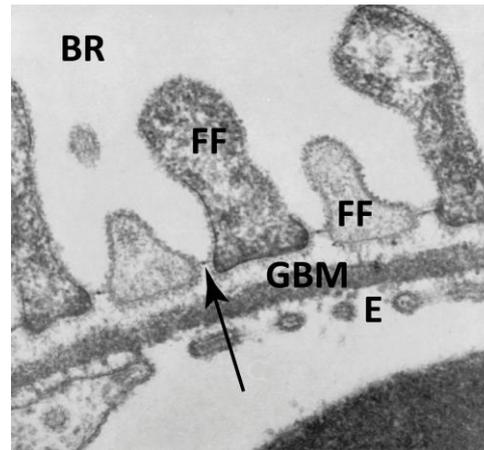


**Abb. 1.2: Aufbau eines Glomerulum.** 1: Distaler Tubulus 2: *Vas efferens* 3: Bowman'scher Raum. 4: Die parietale Epithelzelle (Parietalzelle) 5: Die viszerale Epithelzelle (Podozyt) mit interdigitierenden Fußfortsätzen 6: Glomeruläre Kapillare 7: Proximaler Tubulus 8: Bowman-Kapsel 9: *Vas afferens* 10: Polkissenzellen 11: *Macula densa* (Abb. nach (Stanis 2007)).

Das *Glomerulum*, 1666 von Marcello Malpighi entdeckt, ist die Filtrationseinheit der Niere und hat bei einem erwachsenen Menschen einen Durchmesser von etwa 200  $\mu\text{m}$  (Jennette and Heptinstall 2007) (bei einer Maus ca. 50  $\mu\text{m}$ ). Das durchschnittliche *Glomerulum* einer Maus besteht aus  $213 \pm 22$ , das einer Ratte aus  $674 \pm 129$  Zellen (Basgen et al. 2006; Bertram et al. 1992). Die einzelnen Kapillarknäuel entspringen aus afferenten Arteriolen, die wiederum aus den *Aa. interlobulares* entlassen werden. Sie befinden sich im *Cortex renalis*. Das fenestrierte Endothel dieser Kapillaren bildet die erste von drei Schichten des glomerulären Filters. Von den ca. 680 Gesamtzellen des *Glomerulum* der Ratte sind etwa 250 Endothelzellen (Bertram et al. 1992). Die

glomeruläre Basalmembran (GBM) stellt die zweite und die aufliegenden viszerale Epithelzellen, auch Podozyten genannt, die dritte Schicht des Filters dar (Abb. 1.3). Die GBM besteht aus Kollagen IV, Laminin, Nidogen und Proteoglycanen (Tryggvason and Wartiovaara 2001). Man geht davon aus, dass die Proteoglycane eine elektrische Barriere für negativ geladene Moleküle darstellen. Die Außenseite der GBM wird von Podozyten bedeckt. Podozyten sind differenzierte Epithelzellen, die aus einem Zellkörper, Zellfortsätzen und langen Fußfortsätzen bestehen (Reiser and Sever 2013). Sie sind die größten Zellen im *Glomerulum* der Niere (Jennette and Heptinstall 2007). Die Gesamtzahl der Podozyten pro *Glomerulum* einer Maus beträgt  $89 \pm 10$  (Nicholas et al. 2011). Bei der Ratte sind  $181 \pm 53$  der Zellen pro *Glomerulum* Podozyten (Bertram et al. 1992). Ähnlich den Armen eines Oktopus entlässt der Zellkörper des Podozyten dicke Fortsätze, welche die Oberfläche der Kapillarschlingen durch Bildung interdigitierender Fußfortsätze bedecken (Kerjaschki 2001). Diese Fußfortsätze der Podozyten enthalten Aktinfilamente, welche die Kontraktilität gewährleisten und so eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Podozytenarchitektur spielen. Aktinbindende Proteine wie Synaptopodin und  $\alpha$ -Aktinin sind in den Aktinbündeln lokalisiert (Ichimura et al. 2003; Ronco 2007). Über das Integrin  $\alpha 3 \beta 1$  und den Dystroglycan-Komplex sind die Podozyten an ihrer basalen Zellmembran über Paxilin, Talin und Vinculin an der GBM befestigt (Adler 1992; Drenckhahn and Franke 1988; Raats et al. 2000), wobei der Zellkörper nicht direkt auf der GBM aufliegt (sog. „subpodocyte space“) (Neal et al. 2005). Die interdigitierenden Fußfortsätze benachbarter Podozyten sind über die Schlitzmembran miteinander verbunden. Diese Schlitzmembran besteht aus zahlreichen Proteinen. Das erste je identifizierte Protein in der Schlitzmembran ist das Nephrin (Kestilä et al. 1998). Die einzelnen Nephrinmoleküle sind beteiligt an der Bildung von Poren, die einen Durchmesser von ca. 40 nm haben (Ronco 2007). Außerdem sind Neph-1 und Neph-2 in der Schlitzmembran lokalisiert (Donoviel et al. 2001). Nephrin und Neph-Moleküle interagieren mit Podocin (Boute et al. 2000; Roselli et al. 2002) und „CD2-associated protein“-Molekülen (CD2AP), die ebenfalls in der Schlitzmembran zu finden sind (Schwarz et al. 2001; Shih et al. 2001). Ein weiteres, hier lokalisiertes Molekül ist das FAT (Mitglied der Cadherin Superfamilie, dessen Name auf der Ähnlichkeit mit dem „tumor suppressor homolog“ FAT der *Drosophila* basiert); seine Beziehung zu den

anderen Proteinen in der Schlitzmembran ist noch unklar (Inoue et al. 2001). All diese Moleküle sind an der strukturellen Organisation der Schlitzmembran beteiligt und regulieren ihre Filterfunktion. Die Tatsache, dass Mutationen in den hier lokalisierten Genen verschiedene Krankheitsbilder hervorrufen, unterstreicht die Wichtigkeit der Schlitzmembran für die Filtrationsbarriere (Boute et al. 2000; Donoviel et al. 2001; Kestilä et al. 1998; Shih et al. 2001). So waren z.B. homozygote Nephrin knock-out Mäuse nicht in der Lage, Fußfortsätze auszubilden; die Injektion eines monoklonalen anti-Nephrin Antikörpers löste eine Proteinurie aus (Kerjaschki et al. 2001; Putaala et al. 2001; Topham et al. 1999). Überhaupt gibt es zahlreiche Tiermodelle, die entweder gezielt die Podozyten zerstören, z.B. durch Expression eines attenuierten Diphtherietoxins oder einer Nitroreduktase in den Podozyten, oder knock-outs für die verschiedenen Podozyten- oder Schlitzmembran-spezifischen Gene (Macary et al. 2010; Matsusaka et al. 2005; Wharram et al. 2005). Kollias et al. entwickelten die sog. Thy 1.1 Maus, die ein Thy 1.1 Antigen spezifisch auf Podozyten exprimiert und nach Injektion eines Thy 1.1 Antikörpers innerhalb sehr kurzer Zeit eine Proteinurie entwickelt (Kollias et al. 1987). Wie bei diesem Tiermodell, so ist bei den meisten glomerulären Erkrankungen, die mit einer Proteinurie einhergehen, eine sog. „Fußfortsatzverschmelzung“ (engl. „foot process effacement“) zu erkennen. Das bedeutet, dass die Podozyten ihre Fortsätze in den Zellkörper zurückziehen, und so ein abgeflachtes, einfaches Epithel bilden (Kerjaschki et al. 2001). Die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zu Grunde liegen, sind jedoch noch weitestgehend unbekannt. Außerdem tritt eine Proteinurie auch ohne initiale „Fußfortsatzverschmelzung“ auf (Good et al. 2004; Topham et al. 1999), was darauf hinweist, dass auch andere Defekte im glomerulären Kapillarknäuel eine Proteinurie auslösen können (Ronco 2007). Zumindest für die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und die „minimal change disease“ scheint das Verstreichen der Fußfortsätze ein Auslöser zu sein (Kerjaschki et al. 2001).



**Abb. 1.3: Der dreischichtige glomeruläre Filter.** 1: E = fenestriertes Endothel der Kapillaren 2: GBM = glomeruläre Basalmembran 3: FF = Fußfortsätze der Podozyten. Der Pfeil zeigt auf die Schlitzmembran, welche die einzelnen Fußfortsätze der Podozyten verbindet. BR = Bowman'scher Raum. (Abb. nach Sinn 2012).

Umgeben ist das Kapillarknäuel von der Bowman'schen oder Bowman-Kapsel (Todd and Bowman 1857). Auf dem äußeren Blatt dieser Kapsel liegen die parietalen Epithelzellen als Monolayer. So lässt sich die Bowman-Kapsel auch als „Bowman basement membrane“ (Bowman'sche Basalmembran) bezeichnen. Diese Membran enthält - wie alle Basalmembranen - Laminin, Kollagen IV, Nidogen und Heparansulfat-ähnliche Proteoglykane (Ohse et al. 2009a). Zwischen viszeralen und parietalen Epithelzellen liegt der Raum, in den das Ultrafiltrat (auch Primärharn) abgegeben wird (Bowman'scher Raum). Der Übergang zwischen den beiden Epithelzelltypen des *Glomerulum* findet am vaskulären Pol statt. Dort befinden sich sog. transitorische Zellen, auch parietale Podozyten genannt, die Eigenschaften beider Epithelzellen aufweisen (Appel et al. 2009; Gibson et al. 1992). Die parietalen Epithelzellen sind kleine, flache Zellen mit einer Dicke von lediglich 0,1 -3,5  $\mu\text{m}$  um den *Nucleus* (Madsen et al. 2008), die eine Barriere zwischen Ultrafiltrat und periglomerulärem *Interstitium* bilden. Auf der Oberfläche einiger Parietalzellen befinden sich Mikrovilli und Zilien (0-2 Zilien pro Zelle) (Arakawa and Tokunaga 1977). In einem normalen Rattenglomerulum liegt der Anteil der Parietalzellen bei 14,8% (das sind  $117 \pm 27$  Zellen; Daten für Mausglomerula existieren nicht) (Bertram et al. 1992; Ohse et al. 2009a). Bis zur S-Phase sind beide glomerulären Epithelzelltypen in ihrer embryonalen Entwicklung phänotypisch gleich; so exprimieren beide in dieser Phase den Transkriptionsfaktor WT1 (Wilms-Tumor Protein). Erst in späteren Phasen entwickeln sich Unterschiede. Die

Parietalzellen verlieren WT-1, im Gegensatz zu den Podozyten, und beginnen CD 10 zu exprimieren (Smeets et al. 2006). Die CD 10 Expression ausschließlich in Parietalzellen findet nur in den *Glomerula* von Maus und Ratte statt. Untereinander verbunden sind die Parietalzellen über „tight junctions“, in denen klassischerweise die Claudine 1-3 exprimiert werden (Kiuchi-Saishin et al. 2002). *Zonula occludens-1* Expression konnte ebenfalls mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Nachweismethoden gezeigt werden (Schnabel et al. 1990). Spezifisch für die Parietalzelle im *Glomerulum* ist die Expression zweier Transkriptionsfaktoren der „paired-box gene Familie“, nämlich Pax-2 und Pax-8 (Igarashi et al. 2003; Ohse et al. 2009b). Die Funktion der Parietalzellen im normalen *Glomerulum* ist relativ wenig untersucht. Eine Theorie besagt, dass sie die Permeabilität der GBM senken (Webber and Blackbourn 1971). Die sog. „misdirected filtration“-Theorie besagt, dass, wenn die Parietalzellschicht auf der Bowman-Kapsel fehlt, der Urin in die periglomeruläre Region austritt (Kriz et al. 2001). Rein spekulativ ist die Annahme, dass die Zilien der Parietalzellen eine mechanische Funktion aufweisen (Ohse et al. 2009a). Eine wichtige Eigenschaft der adulten Parietalzelle ist die Tatsache, dass sie in der Lage ist zu proliferieren, da sie, im Gegensatz zu Podozyten, weiterhin Proliferationsmarker exprimiert und keine sog. „post-mitotic cell“ darstellt (Nagata et al. 1993). Primärzellkulturen bieten die Möglichkeit diese Epithelzellen *in vitro* zu studieren; so wurden in der jüngeren Vergangenheit erfolgreich auch Parietalzellen aus murinen *Glomerula* kultiviert (Kabgani et al. 2012). Desweiteren erlauben Tiermodelle die *in vivo* Untersuchung bestimmter Zellmechanismen. Appel et al. entwickelten erstmals ein Mausmodell, das induzierbar Parietalzellen markiert und so die Verfolgung dieser Zellen *in vivo* zulässt (Appel et al. 2009). In dieser Studie konnten die Autoren zeigen, dass im Rahmen der Nierenentwicklung ca. 10% der Podozyten von Parietalzellen oder transitorischen Zellen rekrutiert werden. Andere parietalzell-spezifische Tiermodelle existieren bis heute nicht. Trotzdem konnte in verschiedenen Studien mit Krankheitsmodellen für die Halbmondnephritis („crescentic glomerulonephritis“) sowie für die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) bereits gezeigt werden, dass diese Zellen mitverantwortlich für die Bildung von extrakapillaren Proliferationen sind (Asano et al. 2005; Harrison and MacDonald 1986; Kanemoto et al. 2003; Magil 1985; Smeets et al. 2009a, 2011). In der Halbmondnephritis konnte gezeigt werden, dass sie C-c Chemokine, MCP1

(„monocyte chemoattractant protein-1“), MIP 1 $\alpha$  und  $\beta$  („macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  and  $\beta$ “) produzieren und so für die Infiltration von neutrophilen Granulozyten mitverantwortlich sind (Cockwell et al. 1998, 1999; Smeets et al. 2006). Außerdem exprimieren sie vermehrt Adhäsionsmoleküle, die Liganden für Leukozyten darstellen (Moon et al. 2002). Desweiteren exprimieren sie profibrotische Wachstumsfaktoren wie PDGF („platelet derived growth factor“), TGF- $\beta$  („transforming growth factor  $\beta$ “), CTGF („connective tissue growth factor“), FGF-2 („fibroblast growth factor-2“) und Zytokine (Ito et al. 2001; Kanemoto et al. 2003; Ng et al. 1999; Yokoi et al. 2002). Desweiteren konnten Smeets et al. zeigen, dass eine *de novo* Expression von CD44 in den Parietalzellen, die sich in den Proliferaten einer Halbmondnephritis befinden, detektiert werden konnte (Smeets et al. 2009a). Dieses Glykoprotein ist involviert in Zell-Zell Interaktionen, Zelladhäsion und -migration und gilt als Aktivierungsmarker für Parietalzellen (Fatima et al. 2012; Smeets et al. 2009a,b). Im FSGS-Mausmodell (Thy 1.1) konnte gezeigt werden, dass sich die proliferierenden Epithelzellen als negativ für alle Podozytenmarker, jedoch positiv für CD 10, einen Parietalzellmarker, darstellten (Smeets et al. 2006). In adulten Organismen scheinen die Parietalzellen sich selbst und andere Zelltypen der Niere zu regenerieren, was, wie bereits erwähnt, möglich ist, da die Parietalzellen auch im adulten Zustand Proliferationsmarker exprimieren (Lazzeri et al. 2007; Pabst and Sterzel 1983; Ronconi et al. 2009).

Neben Epithelzellen und Endothelzellen wurde in den 60er Jahren ein dritter Zelltyp im *Glomerulum* der Niere entdeckt: die Mesangialzellen (Farquhar and Palade 1962; Jennette and Heptinstall 2007). Diese sternförmigen Zellen liegen zwischen den Kapillaren eingebettet in einer extrazelluläre Matrix (ECM), die von den Mesangialzellen selbst gebildet wird. Die ECM besteht aus Kollagen IV und V, Laminin A, B1, B2, Fibronektin und den Heparansulfat und Chondroitinsulfat Proteoglykanen sowie Entactin und Nidogen. Die Mesangialzellen machen 30-40% der glomerulären Zellpopulation aus (Olivetti et al. 1977; Scindia et al. 2010), d.h von ca. 680 Zellen des durchschnittlichen *Glomerulum* einer Ratte sind  $245 \pm 45$  Mesangialzellen (auch hier existieren keine Zahlen für Mausglomerula) (Bertram et al. 1992). Zusammen bilden die Mesangialzellen und die ECM das sog. Mesangium. Es werden 2 Typen von Mesangialzellen unterschieden. Die größere Population mit >90% stellen die

kontraktilen Perizyten dar, die „smooth muscel actin“ und Myosin beinhalten (Farquhar and Palade 1962; Stockand and Sansom 1998). Diese Zellen bilden die typische Sternform durch Fortsätze, die mit der GBM oder dem juxtaglomerulären Apparat kontaktieren. Durch Ihre Kontraktilität sind sie in der Lage, die Größe der Kapillarlumina zu verändern und dadurch die glomeruläre Filtration zu beeinflussen (Scindia et al. 2010). Desweiteren sind sie metabolisch aktiv und synthetisieren z.B. Zytokine und Prostaglandine (Sraer et al. 1993). Die kleinere Gruppe, etwa 3-10% der Gesamtpopulation, stellen die aus dem Knochenmark stammenden, MHCII positiven Zellen dar. Diese immunkompetente Gruppe der Mesangialzellen ist phagozytosefähig (Scindia et al. 2010).

Der Bowman'sche Raum öffnet sich in den proximalen Tubulus, in den der Primärharn abgegeben wird. Das gefilterte Plasma verlässt über die efferente Arteriole das *Glomerulum* und wird, wie bereits erläutert, letztendlich in die *V. cava inferior* (oder *V. cava caudalis*) entlassen. Die afferente Arteriole hat einen etwas größeren Durchmesser, auf Grund der dickeren *Tunica muscularis* und eines größeren Lumens. Histologisch ist eine Differenzierung zwischen afferenter und efferenter Arteriole aber oft schwierig (Jennette and Heptinstall 2007). In der *Tunica muscularis* der afferenten Arteriole befinden sich modifizierte Myozyten, die sog. Polkissenzellen, die für die Reninproduktion verantwortlich sind.

### 1.1.1.2 DIE GLOMERULÄRE FILTRATION

Die Arbeitsleistung der *Glomerula* lässt sich über die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmen. GFR ist das Volumen, das pro Zeiteinheit in den *Glomerula* der Niere gefiltert wird. Sie kann gemessen werden anhand der Ausscheidung von Substanzen, die glomerulär ungehindert filtriert werden und im Tubulussystem keiner Rückresorption oder Sekretion unterliegen (z.B. Kreatinin oder Inulin) (Rehberg 1926; Stevens and Levey 2009).

Die Formel für die Berechnung der GFR lässt sich aus der Formel für die Clearance (Maß für die Menge der Substanz X, die pro Zeiteinheit aus dem Plasma eliminiert wird) ableiten. Die Grundformel lautet wie folgt:

$$\begin{aligned} GFR &= \frac{\text{Vol. des glomerulären Filtrats}}{\text{Zeit}} \\ &= \frac{\text{Konz. Substanz X im Harn} \cdot \text{Vol. Harn}}{\text{Konz. Substanz X im Plasma} \cdot \text{Zeit}} \end{aligned}$$

Auch wenn in der Klinik häufig für die Bestimmung der GFR herangezogen, unterliegt Kreatinin als Endprodukt des Muskelstoffwechsels in seiner Plasmakonzentration verschiedenen Schwankungen. So ist die Plasmakonzentration abhängig von Muskelmasse, Körpergewicht, Ernährung (Aufnahme von Fleischprodukten) oder Veränderungen der Muskulatur (Trauma, Entzündung, Dystrophie) (Stevens and Levey 2009). Aus diesem Grund gilt Kreatinin nicht als optimaler Clearance-Marker. Es existieren verschiedene Abwandlungen der Grundformel, die diese Störgrößen wie die Körpermasse/-oberfläche, Alter, Geschlecht, Hautfarbe, Ernährung etc. berücksichtigen und z.B. auf die Urinsammlung als häufige Fehlerquelle verzichten (Cockcroft-Gault-Formel, MDRD-Formel, Counahan-Barratt-Formel) (Cockcroft and Gault 1976; Counahan et al. 1976; Levey et al. 1993). Dennoch ist heute die aufwändigere Untersuchung der Inulin-Clearance der Goldstandard zur Bestimmung der GFR bei Mensch und Tier (Stevens and Levey 2009). Inulin ist ein 5200 Dalton großes, neutrales Fructosepolymer, das für die GFR-Messung i.v. verabreicht wird. Da es sich um eine Substanz handelt, die frei im *Glomerulum* filtriert und im tubulären System weder resorbiert, sezerniert, synthetisiert noch metabolisiert wird, ist Inulin ideal für die Messung der glomerulären Filtrationsrate geeignet (Smith 1953; Stevens and Levey 2009).

Die Passage des glomerulären Filters ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Neben der Größe des Moleküls und der Poren des Filters ist vor allem die elektrische Ladung entscheidend (Chang et al. 1975a,b). So konnte in zahlreichen Studien an Ratten und Hunden gezeigt werden, dass anionische Makromoleküle den glomerulären Filter schlechter passieren als neutrale, die wiederum schlechter als kationische Moleküle passieren (Bohrer et al. 1978; Guasch et al. 1993; Rennke et al. 1978; Vanrenterghem et al. 1980). Das Maß für die Durchlässigkeit des Filters bezüglich eines Stoffes ist der sog. *Siebkoeffizient* ( $S_g$ ), der die Konzentration im Filtrat in Relation zur Konzentration im Plasma angibt. Stoffe mit einem Molekülradius von  $r \leq 1,8$  nm (Molekülmasse bis

ca. 10.000 Dalton;  $S_g = 1$ ) können den Filter problemlos passieren und solche Stoffe mit einem Radius  $\geq 4,4$  nm (Molekülmasse  $\geq 69.000$ - $80.000$  Dalton;  $S_g = 0$ ) werden im gesunden *Glomerulum* zurückgehalten. Albumin, als eines der kleinsten Proteine im Blut, hat zwar nur einen Radius von ca. 3,4 nm, aber auf Grund der Tatsache, dass es sich um ein anionisches Molekül handelt, lediglich einen Siebkoeffizienten von 0,0003 (Despopoulos and Silbernagl 2007). Eine jüngere Theorie und eine Erklärung dafür, dass der glomeruläre Filter nicht „verstopft“, stellt das sog. elektrokinetische Modell dar, welches davon ausgeht, dass während der Filtration elektrische Potentialdifferenzen entstehen (Hausmann et al. 2010). Täglich werden beim Menschen ca. 180 l, bei der Maus ca. 0,3 l Primärharn gebildet (Ronco 2007; Vallon et al. 2009). Der entstehende Primärharn enthält Elektrolyte und niedermolekulare Moleküle in vergleichbarer Konzentration wie das Plasma und ist somit isoton. Hochmolekulare Proteine fehlen im Ultrafiltrat der gesunden Niere fast vollständig.

Ein weiterer, an der Filtration maßgeblich beteiligter Faktor ist der Blutdruck. So wird der Filtrationsprozess durch den effektiven Filtrationsdruck  $P_{eff}$  angetrieben.

$$P_{eff} = P_{Kap} - P_{Bow} - \pi_{Kap}$$

Dies ist die Differenz des hydrostatischen Drucks  $P$  in den Kapillaren ( $P_{Kap} \approx 45$ - $50$  mmHg) bzw. der Bowman-Kapsel ( $P_{Bow} \approx 13$  mmHg), vermindert um die Differenz der kolloidosmotischen Drücke  $\pi$  zwischen Kapillarblut und Ultrafiltrat ( $\pi_{Kap} \approx$  im Mittel 20mmHg). Wichtig dabei ist, dass  $\pi_{Kap}$  von *Vas afferens* zu *Vas efferens* durch den kontinuierlichen Entzug von Wasser aus dem Plasma deutlich zunimmt. So erreicht  $\pi_{Kap}$  bei 20% Wasserentzug schließlich Werte von 35 mmHg und lässt  $P_{eff}$  auf 0 sinken und die Filtration versiegen (Brenner et al. 1986b; Klinke and Silbernagl 1994). Der Filtrationsdruck der *Vasa efferentia* unterliegt außerdem einer starken Autoregulation, diese kann myogen bei Änderung der Wandspannung (Bayliss-Effekt) oder über tubulo-glomeruläre Rückkopplung, das sog. tubulo-glomeruläre Feedback (TGF), geschehen (Bayliss 1902; Schnermann and Briggs 2008). Die Region, in der sich der distale Tubulus dem *Vas afferens* des *Glomerulum* nähert, wird als juxtaglomerulärer Apparat bezeichnet (Abb 1.2. Nr 1, 10 und 11). Dieses Gebiet ist in der Lage den renalen Blutfluß und die GFR mit Hilfe des tubulo-glomerulären Feedback und der Ausschüttung von Renin zu kontrollieren (Bell et al. 2003; Peti-Peterdi and Harris

2010). Hier befindet sich die sog. *Macula densa*. Die Zellen dieses spezialisierten Abschnittes des distalen Tubulus stehen in direktem Kontakt zum *Vas afferens* des *Glomerulum* und unterscheiden sich morphologisch deutlich von den übrigen Zellen dieses Tubulusabschnittes (Brenner et al. 1986b). Die afferente Arteriole des *Glomerulum* enthält am Kontaktpunkt mit der *Macula densa* Epitheloidzellen, die in der Lage sind Renin zu bilden (sog. Polkissenzellen), welche ebenfalls zum juxtaglomerulären Apparat gehören (Peti-Peterdi and Harris 2010; Thureau and Schnermann 1965). Außerdem zählen extraglomeruläre Mesangialzellen zu dem Komplex des juxtaglomerulären Apparates.

Die Besonderheit der Zellen der *Macula densa* besteht darin, dass sie apikal NaCl-Transportmechanismen, wie z.B. den Furosemid sensitiven NKCC2 ( $\text{Na}^+ : 2\text{Cl}^- : \text{K}^+$  Cotransporter) aufweisen (Lorenz et al. 1991; Peti-Peterdi and Harris 2010). Zusätzlich wurde hier ein  $\text{Na}^+ : \text{H}^+$ -Austauscher (NHE) identifiziert (Peti-Peterdi et al. 2000). Dadurch sind die Zellen der *Macula densa* sensitiv für Veränderungen im Salzgehalt der Tubulusflüssigkeit. Steigt nun die GFR, steigt ebenfalls die Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in den spezialisierten Epithelzellen, was zur Ausschüttung von Adenosin führt, welches seinerseits eine Vasokonstriktion des jeweiligen *Vas afferens* bewirkt und so die GFR wieder senkt. Im umgekehrten Fall, also bei niedrigem Salzgehalt der Flüssigkeit im distalen Tubulus (also z.B. bei niedriger GFR) werden NKCC2 vermittelt ERK 1/2 („extracellular regulated kinase 1/2“), MAP-Kinasen („mitogen activated“), COX-2 (Cyclooxygenase 2) und mPGEs („microsomal prostaglandin E synthase“) in den *Macula densa* Zellen aktiviert (Harris et al. 1994; Lorenz et al. 1991; Peti-Peterdi and Harris 2010; Yang et al. 2000). Die dadurch ausgelöste Synthese und Ausschüttung von Prostaglandinen ( $\text{PGE}_2$ ) bewirkt die Freigabe von Renin, durch Bindung an Rezeptoren der Polkissenzellen und darüber die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems (Peti-Peterdi and Harris 2010). Das in der Leber gebildete Angiotensinogen wird zu Angiotensin, von dem das ACE („Angiotensin converting enzyme“) zwei Aminosäuren abspaltet und so Angiotensin II entsteht. Dieses Peptidhormon bewirkt eine Vasokonstriktion des *Vas efferens* und somit eine Steigerung der GFR (Carey and Siragy 2003).

### 1.1.2 PARIETALZELASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN DER NIERE

Akute glomeruläre Schädigungen gehen häufig mit einer pathologischen Proliferation von Zellen innerhalb der glomerulären Kapsel einher, die schließlich zum Verlust der Nierenfunktion führt. Vor allem bei der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und der sehr akut verlaufenden und rasch progressiven *Glomerulonephritis* (RPGN oder auch Halbmondnephritis) stellt das Auftreten proliferierender Epithelzellen einen pathognomonischen Befund dar.

Der dadurch verursachte narbige Untergang von *Glomerula* führt in letzter Konsequenz zu irreversibler Niereninsuffizienz und lebenslanger Abhängigkeit von Nierenersatzverfahren.

#### 1.1.2.1 FOKALE SEGMENTALE GLOMERULOSKLEROSE (FSGS)

Die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist eine der verbreitetsten glomerulären Erkrankungen und ein Hauptgrund für die Entstehung einer Niereninsuffizienz (Haas et al. 1997). Wie der Name bereits vermuten lässt, ist sie charakterisiert durch das fokale Auftreten segmentaler glomerulärer Läsionen, d.h., dass in einer an FSGS erkrankten Niere in einzelnen *Glomerula* Segmente des Kapillarknäuels vernarbt sind. Diese Vernarbungen bestehen aus Adhäsionen zwischen Bowman-Kapsel und dem Kapillarknäuel, Hypertrophie der Podozyten, Sklerose des *Mesangium* und der Zerstörung der glomerulären Kapillaren, verbunden mit Hyalinose und der Bildung von intrakapillaren Schaumzellen (Jennette and Heptinstall 2007). Die Morphologie der FSGS-Läsionen divergiert. Es wurden fünf Varianten identifiziert und eine Klassifizierung erstellt (D'Agati et al. 2004) (Tab. 1.1). Die erste Variante der FSGS ist die sog. perihiläre Form (engl. perihilar) (Herlitz et al. 2010; Hodgkin et al. 2009; Kambham et al. 2001; Rennke and Klein 1989; Thomas et al. 2006). Hier sind die Läsionen hauptsächlich am vaskulären Pol des *Glomerulum* zu finden. Die zweite Variante ist die Spitzen-Variante (engl. tip) (Howie et al. 2005; Stokes et al. 2004). Hier ist die Läsion in der Nähe des Urinpols lokalisiert. Drittens ist die zellreiche Variante (engl. cellular) beschrieben (Stokes et al. 2006; Thomas et al. 2006). Diese ist durch endokapillare Hyperzellularität charakterisiert. Die kollabierende Form der FSGS (engl. collapsing) ist die vierte Variante (Li et al. 2002; Markowitz et al. 2001,2010; Moudgil

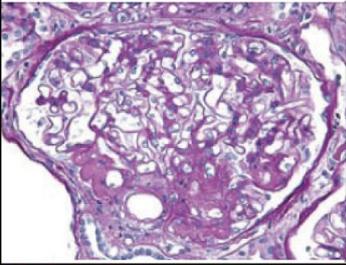
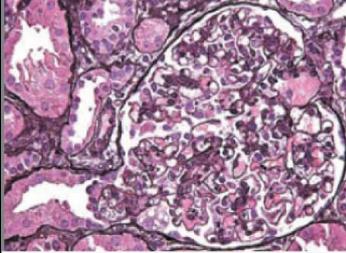
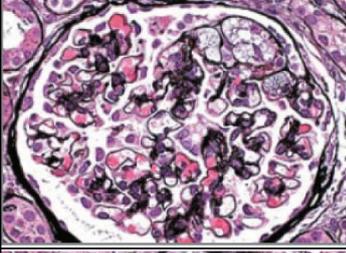
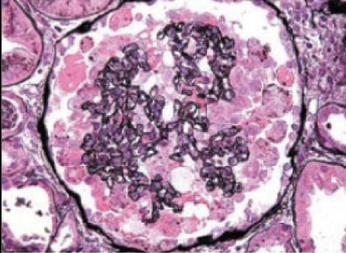
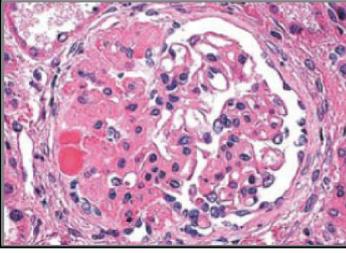
et al. 2001; Tomlinson et al. 2003; Wyatt et al. 2008). Hierbei kollabiert das Kapillarknäuel in Kombination mit Hypertrophie und Hyperplasie der Epithelzellen. Die fünfte und letzte Variante ist die klassische oder „nicht anders spezifizierte“ Form der FSGS („NOS = not otherwise specified“) (D’Agati et al. 2004). Diese Form zeigt histologisch Läsionen, die in keiner der anderen Gruppen beschrieben sind.

Auch die Gründe für die Entstehung dieser Erkrankung und der vielfältigen Morphologie variieren. So spricht man von primärer und sekundärer FSGS (D’Agati et al. 2011). Die primäre Form ist idiopathisch. Es wird aber vermutet, dass möglicherweise ein zirkulierender Permeabilitätsfaktor für die Entstehung dieser Form der FSGS verantwortlich ist (McCarthy et al. 2010; Wei et al. 2011). Bei der sekundären Form gibt es vier Unterformen: Erstens kommen familiäre oder genetische Gründe in Frage, die durch Mutationen verschiedener Podozyten-Gene zur Entstehung der FSGS führen (die häufigsten Mutationen betreffen Podocin und Nephtrin) (Santín et al. 2011). Genetische Defekte sind in bis zu zwei Drittel der im ersten Lebensjahr an FSGS erkrankten Patienten identifiziert worden (Hinkes et al. 2007). Altersunabhängig zeigen Menschen mit afro-amerikanischer Abstammung eine genetische Prädisposition für das Auftreten einer FSGS (Genovese et al. 2010; Kao et al. 2008). Zweitens bestehen virus-assoziierte Formen der FSGS, die durch Infektionen mit dem HI-Virus Typ 1 (Bruggeman et al. 2000; Wyatt et al. 2008), Parvovirus-B19 (Moudgil et al. 2001), Simian Virus 40 (Li et al. 2002), Zytomegalievirus (Tomlinson et al. 2003) oder dem Epstein-Barr-Virus (Iwama et al. 1998) zur Sklerosierung einzelner *Glomerula* führen können. Drittens ist die Entstehung einer FSGS aufgrund von Drogen-/Medikamenten-Einnahme zu nennen. Vor allem die Einnahme von Heroin (Friedman and Tao 1995), Interferon alpha, beta und gamma (Markowitz et al. 2010), Lithium, Pamidronat (Markowitz et al. 2001), Sirolimus, Calcineurin-Inhibitor und anabolen Steroiden (Herlitz et al. 2010) führt hierbei zu einer Auslösung. Viertens gibt es die adaptive Form der FSGS. Hier sind zwei Ausgangssituationen zu berücksichtigen. Dies sind zum einen Konditionen mit reduzierter Nierenmasse. Dazu gehören u.a. Oligomeganephronie, niedriges Geburtsgewicht (Hodgin et al. 2009), Nierendysplasie sowie alternde Nieren. Zum anderen sind Konditionen mit initial normaler Nierenmasse wie systemischer Bluthochdruck, chronische vaso-okklusive Prozesse wie Nierenarterienstenosen, Adipositas (Kambham et al. 2001), Bodybuilding und die Sichelzellanämie ursächlich.

Trotz der Identifizierung dieser verschiedenen Faktoren, die als Ursache für die Entstehung einer FSGS möglich sind, sind 80% der FSGS-Fälle primär (idiopathisch) (D'Agati et al. 2011).

Auch die Pathogenese der FSGS ist vielfach untersucht. Zunächst galt die Hypothese, dass die Mesangialzellen die entscheidende Rolle in der Entstehung der FSGS spielen. Hierbei sollte die segmentale Sklerose Folge einer Schädigung von Mesangialzellen sein, gefolgt von Proliferation dieser Zellen und der daraus resultierenden Bildung von extrazellulärer Matrix (Floege et al. 1992; Jacobson 1991; Kashgarian and Sterzel 1992; Striker et al. 1989). Heute sind die Epithelzellen im Fokus der Pathogenese der FSGS. Vor allem in der zellulären und der kollabierenden Form der FSGS ist eine Hyperplasie der Epithelzellen deutlich (D'Agati 2012). Zunächst galt die Aufmerksamkeit den viszerale Epithelzellen, also den Podozyten. Vor allem die Entdeckung von Mutationen in verschiedenen podozytären Proteinen, wie z.B. Nephtrin und Podocin, führte zu diesem Umdenken (Boute et al. 2000; Kestilä et al. 1998). Besonders die Gruppe um Prof. Kriz forschte mit Hilfe von verschiedenen Rattenmodellen an der Entstehung der FSGS im Hinblick auf die podozytären Veränderungen (Kretzler et al. 1994; Kriz et al. 1994, 1995, 1996, 1998, 2001; Nagata and Kriz 1992). Später wurden Podozyten mit Hilfe von Toxinrezeptoren (oder einer bakteriellen Nitroreduktase), die unter einem Podozyten-spezifischen Promotor exprimiert wurden, aufzucht. Der Verlust von mehr als 40% der Podozyten führte zu einer deutlichen FSGS in Korrelation mit Proteinurie und Niereninsuffizienz (Macary et al. 2010; Matsusaka et al. 2005; Wharram et al. 2005). Heute weiß man auf Grund von Markerstudien, dass die Proliferate vor allem aus Parietalzellen bestehen. Besonders Smeets et al. konnten mit Hilfe der Thy 1.1-Maus (Kollias et al. 1987; Smeets et al. 2003) zeigen, dass es vor allem die Parietalzellen sind, die nach eintretendem Podozytenschaden aktiviert werden (CD44-Expression) und proliferieren (Ichikawa et al. 2005). Dabei gilt die Adhäsion der parietalen Epithelzellen mit dem Kapillarknäuel als „point of no return“ (Dijkman et al. 2005; Elger and Kriz 1998; Smeets et al. 2009a, 2011).

Früher als eine einzelne Erkrankung mit einem gemeinsamen Entstehungsweg gesehen, wird die FSGS nun als Gruppe klinisch-pathologischer Syndrome betrachtet, die eine glomeruläre Läsion gemeinsam haben (D'Agati et al. 2011).

Histologie	Glomeruläre Läsion	Definiton	Assoziation	Klinik
Perihilär (perihilar)		Perihiläre Hyalinose und Sklerose am vaskulären Pol. In adaptiver FSGS häufig verbunden mit Glomerulomegalie. Die Fußfortsatzverschmelzung ist relativ mild und fokal.	Häufig in adaptiver Form, assoziiert mit Hypertensie, Adipositas usw.. Die Läsionen treten am vaskulären Pol auf. Das hängt vermutlich mit dem erhöhten Filtrationsdruck in der afferenten Ateriole und der damit verbundenen kompensatorischen Vasodilatation zusammen.	In der adaptiven FSGS. Die Patienten zeigen häufig subnephrotische Proteinurie und ein normales Serumalbumin-Level.
Spitzen-Läsion (Tip)		Segmentale Läsion, die den Urinpol involviert. Entweder durch eine Adhäsion oder den Zusammenschluß von Podozyten und Tubulusepithel. Im Vergleich zu den anderen Varianten findet man hier am wenigsten tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose. Deutliche Fußfortsatzverschmelzung.	Normalerweise primär. Möglicherweise durch physischen Stress des paratubulären Segments aufgrund des proteinreichen Filtrats ausgelöst.	Geht normalerweise mit dem plötzlichen Auftreten des nephrotischen Syndroms einher. Häufiger bei Weißen. Die Variante mit der besten Prognose. Spricht am besten auf Glucokortikoidtherapie an.
zellreich (cellular)		Ausgedehnte segmentale Läsionen mit endokapillärer Hyperzellularität, häufig verbunden mit Schaumzellen und infiltrierenden Leukozyten. Hyperplasie der glomerulären Epithelzellen. Die Fußfortsatzverschmelzung ist erheblich.	Normalerweise primär, aber auch in verschiedenen sekundären Formen vorgekommen. Das ist die seltenste Variante. Wahrscheinlich ein früher Zeitpunkt in der Entwicklung sklerotischer Läsionen.	Gewöhnlich sichtbar beim nephrotischen Syndrom.
kollabierend (collapsing)		Kollaps des glomerulären Kapillarknäuels mit Hypertrophie und Hyperplasie der viszeralen Epithelzellen. Die hyperplastischen Epithelzellen können den Bowman'schen Raum füllen, ähnlich wie Halbmonde. Häufig bilden sich tubuläre Mikrozysten. Die Fußfortsatzverstreicherung ist deutlich.	Primär und sekundär bei: verschiedenen Virusinfektionen, anhaltender Einnahme versch. Drogen oder vaso-okklusiven Erkrankungen (s.Text)	Aggressivste Variante der primären FSGS. Häufig bei Afro-Amerikanern und bei schwerem nephrotischem Syndrom. Schlechteste Prognose, da diese Variante wenig auf die Glucokortikoidtherapie anspricht.
klassisch (NOS)		Die allgemeine Form der FSGS. Trifft keine Definiton der anderen Gruppen. Fußfortsatzverschmelzung ist variabel.	Primär oder sekundär. Scheint die häufigste Form zu sein. Andere Varianten können sich mit der Zeit zu dieser Form entwickeln.	Kann beim nephrotischen Syndrom oder subnephrotischer Proteinurie auftreten.

**Tab. 1.1: Formen der FSGS.** Tabelle modifiziert nach (D'Agati et al. (2011), The New England Journal of medicine, Vol 365,Seiten 2398-2411)

Klinisch zeigt sich die FSGS bei 75% der Patienten durch ein nephrotisches Syndrom, bei 25% liegt eine Proteinurie ohne weitere Symptome vor. Das Ziel der Therapie ist in jedem Fall die Reduktion der Proteinurie (Remission) und die Erhaltung der Nierenfunktion. Schon eine Teil-Remission ist lebensverlängernd (Korbet 1998; Troyanov et al. 2005). Da man davon ausgeht, dass eine dysregulierte Immunantwort ursächlich für die Entstehung der FSGS ist, wird je nach Schweregrad der histologischen Veränderungen, also bei Erwachsenen nach Biopsie der Niere, mit

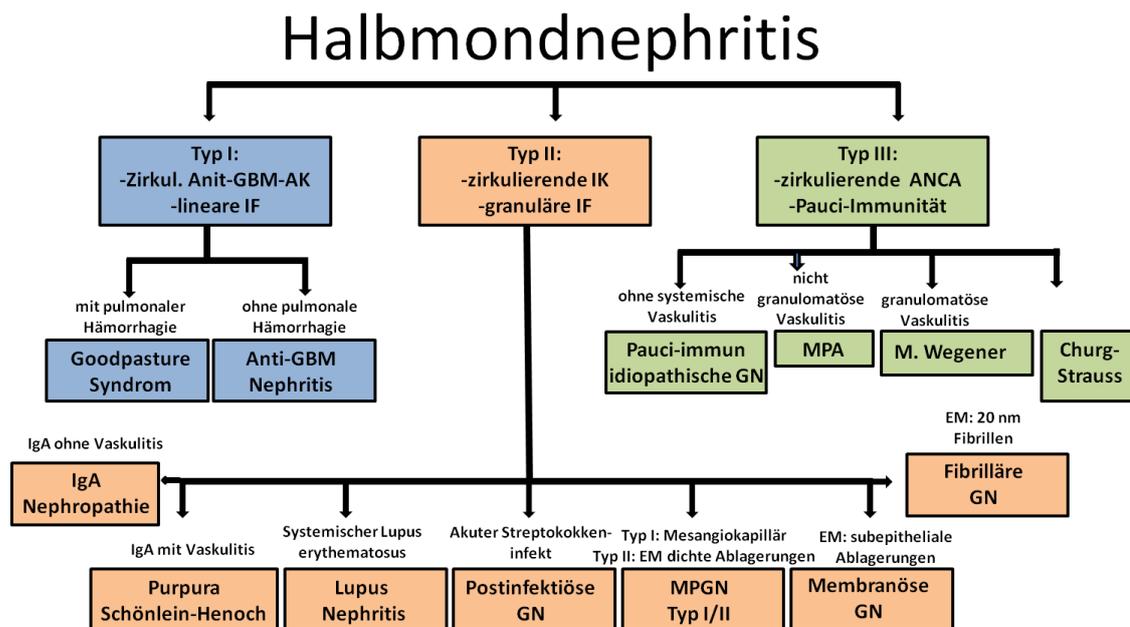
Glukokortikoiden (i.d.R. Prednison) behandelt (in Kombination mit einem Calcineurininhibitor möglich) (Faul et al. 2008). Diese wirken auch direkt positiv auf die Podozyten (Schönenberger et al. 2011). Zusätzlich wird initial eine RAS-Blockade (ACE-Hemmer) und eine natriumarme Ernährung verordnet. Natürlich muss bei der sekundären Form der FSGS zunächst die primäre Ursache behandelt werden (D'Agati et al. 2011).

### 1.1.2.2 RASCH PROGRESSIVE GLOMERULONEPHRITIS (RPGN)

Die rasch progressive *Glomerulonephritis* (engl. „rapidly progressive glomerulonephritis“) oder auch Halbmondnephritis (engl. „crescentic glomerulonephritis“) ist eine Erkrankung, die innerhalb von Tagen bis Wochen zum Nierenversagen führt. Immer sind Autoantikörper ursächlich für die Entstehung dieser Form der *Glomerulonephritis*. So steht sie im Zusammenhang mit anti-GBM Antikörpern, aber auch zahlreichen anderen pathologischen Mechanismen (Jennette and Thomas 2001). Sie kann idiopathisch oder im Zusammenhang mit verschiedenen systemischen Erkrankungen, wie dem Goodpasture-Syndrom, dem *Lupus erythematosus*, der Wegener-Granulomatose (Woodworth et al. 1987; Woywodt et al. 2006), oder der *Panarteriitis* (oder *Polyarteriitis*) *nodosa* auftreten (Kussmaul and Maier, 1866).

Man unterscheidet drei Formen der RPGN (Abb. 1.4): Die Antibasalmembran-*Glomerulonephritis* (anti-GBM) stellt die seltenste Form der RPGN dar. Diese Form kann ohne Lungenbeteiligung (sehr selten) oder mit Lungenbeteiligung (= Goodpasture-Syndrom, oft Männer vor dem 40. Lebensjahr (30–40%)) auftreten (Zhou et al. 2010). Für die Pathogenese dieser Form gibt es verschiedene Vermutungen, die hier nur kurz dargestellt werden sollen. Zum einen vermutet man eine genetische Prädisposition, die durch verschiedene Umwelteinflüsse zur Entstehung der *Nephritis* führen kann (Pusey 2003; Yang et al. 2009). Die Bildung von Autoantikörpern ist in jedem Fall der anti-GBM *Nephritis* beschrieben. Das Zielantigen ist dabei das  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  („ $\alpha 3$  chain non-collagen I domain of type IV collagen“) (Kalluri et al. 1995). Es konnten zwei im Hinblick auf die Konformation unterschiedliche Epitope der Autoantikörper definiert werden:  $E_A$  und  $E_B$  (Borza et al. 2000; Netzer et al. 1999). Wie genau es zur

Bildung dieser konformationsabhängigen Epitope kommt, ist unklar. Wichtig für die Entstehung des Goodpasture-Syndroms ist auch das HLA-Molekül („human leucocyte antigen“) (Pedchenko et al. 2010). Besonders das HLA-DRB1\*1501-Allel scheint ein genetischer Marker für die Anfälligkeit der anti-GBM Erkrankung zu sein (Yang et al. 2009). Auch der Fcγ-Rezeptor spielt eine Rolle in der Entwicklung dieser *Nephritis*. So konnte in Fcγ-Rezeptor knock-out Mäusen, trotz hohem IgG-Level und Immunkomplexablagerungen in der Niere, ein deutlich geringerer Nierenschaden nachgewiesen werden (Clynes et al. 1998). Außerdem wird eine T-Zell-vermittelte Immunität als ursächlich gesehen. Besonders CD4+- und CD8+-T-Zellen sind hier involviert (Reynolds et al. 2002; Wu et al. 2002). Histologisch lassen sich die Immunglobuline Typ IgG und C<sub>3</sub>-Komplement in linearer Anordnung an der Basalmembran nachweisen.



**Abb. 1.4: Formen der rasch progressiven Glomerulonephritis (Halbmondnephritis).** GBM = glomeruläre Basalmembran, AK = Antikörper, IF = Immunfluoreszenz; IK= Immunkomplexe, ANCA = „anti-neutrophil cytoplasmatic antibody“, GN = *Glomerulonephritis*, MPA = mikroskopische *Polyangiitis*, MPGN = membranoproliferative *Glomerulonephritis*, EM = Elektronenmikroskopie. Modifiziert nach (Birck and Van Der Woude (2003), *Der Internist* 44(9), Seiten 1107-1119).

Die zweite Form der RPGN ist die Ablagerung von granulären Immunkomplexen in sog. „humps“ wie beim *Lupus erythematosus*. Diese Ablagerungen finden sich kapillar und

mesangial. Auch bei der RPGN im Rahmen eines *Lupus erythematosus* spielt die Bildung von Autoantikörpern die entscheidende Rolle in der Entstehung (Toong et al. 2011). Die vorherrschende Hypothese ist, vereinfacht zusammengefasst, dass Nukleosomen aus unzureichend abgebauten apoptotischen Zellen freigesetzt werden, die an Autoantikörper binden, welche von selbst-reaktiven B-Zellen sezerniert werden (diese B-Zellen wurden T-Zell-abhängig einem Isotypenwandel unterzogen) (Radic et al. 2004). Jene Komplexe lagern sich dann in den *Glomerula* ab und führen über Komplementaktivierung zur Gewebszerstörung (Rahman and Isenberg 2008). Vor allem anti-DNA Antikörper konnten sowohl in Mausmodellen als auch in humanen Patienten identifiziert werden (Levinsky et al. 1977; Toong et al. 2011). Trotzdem entwickeln nicht alle Patienten mit anti-DNA Antikörpern und Ablagerungen von Immunkomplexen eine *Nephritis* (Cruchaud et al. 1975). So spielen wahrscheinlich noch andere Faktoren eine Rolle. Eine Vorstellung ist, dass Isotyp und Subklasse der Antikörper wichtig sind (vor allem der IgG-Isotyp (Förger et al. 2004)), eine andere, dass die Spezifität der anti-DNA Antikörper eine Rolle spielt (Mortensen and Rekvig 2009; Mostoslavsky et al. 2001). Da die Autoantikörper normalerweise durch das reticuloendotheliale System (RES) eliminiert werden, vermutet man auch hier eine Beteiligung des Fcγ-Rezeptors (Bergtold et al. 2006; Li et al. 2009). Diese zweite Form der RPGN kann aber auch als Komplikation jeder anderen primären und sekundären Immunkomplex-*Glomerulonephritis* auftreten (z.B. als Folge einer IgA Nephropathie, einer membranösen GN, oder einer postinfektiösen GN, Abb. 1.4), wobei die Auslöser häufig unklar sind (Cai et al. 2008).

Die dritte Form ist die ANCA („anti-neutrophil cytoplasmic antibody“)-assoziierte *Vaskulitis* als häufigster Grund für die Entstehung einer RPGN (Berden et al. 2010). Diese gehört zu den pauci-immunen Vaskulitiden. Sie kann sich in einer idiopathischen *Glomerulonephritis* ohne generalisierte *Vaskulitis* zeigen oder generalisiert im Rahmen von *Panarteriitis nodosa*, Wegener-Granulomatose oder Churg-Strauss-Syndrom auftreten (Birck and Van der Woude, 2003). Per Definition sind Autoantikörper gegen Antigene im Zytoplasma von neutrophilen Granulozyten und Monozyten vorhanden (Tervaert et al. 1989). Man unterscheidet die Antikörper mit perinukleärem Fluoreszenzmuster (pANCA = perinukleäre ANCA), die spezifisch sind für die Myeloperoxidase (MPO) z.B. bei *Panarteriitis nodosa* (Falk and Jennette 1988) und

solche mit zytoplasmatischem Fluoreszenzmuster (cANCA = zytoplasmatische ANCA) bei der Wegener-Granulomatose. Das Zielantigen der cANCA ist meist die Proteinase3 (PR3) (Jenne et al. 1990). Auch atypische ANCAs mit anderen Zielantigenen (z.B. Elastase) sind beschrieben (Seidowsky et al. 2007). Bei vielen Erkrankungen wurde eine Assoziation mit ANCA festgestellt (z.B. Tuberkulose), weswegen diese Erkrankungen bei der Diagnosestellung immer ausgeschlossen werden sollten (Adebajo et al. 1993). Verschiedene ANCA-spezifische ELISAS werden dazu verwendet. In einem Mausmodell zeigte sich die direkte pathogenetische Rolle der ANCA und die Komplementbeteiligung (Xiao et al. 2002). In dieser Studie erhielten Mäuse ein anti-Maus-MPO IgG und entwickelten eine RPGN. Komplementdefiziente Mäuse zeigten keine Veränderungen.

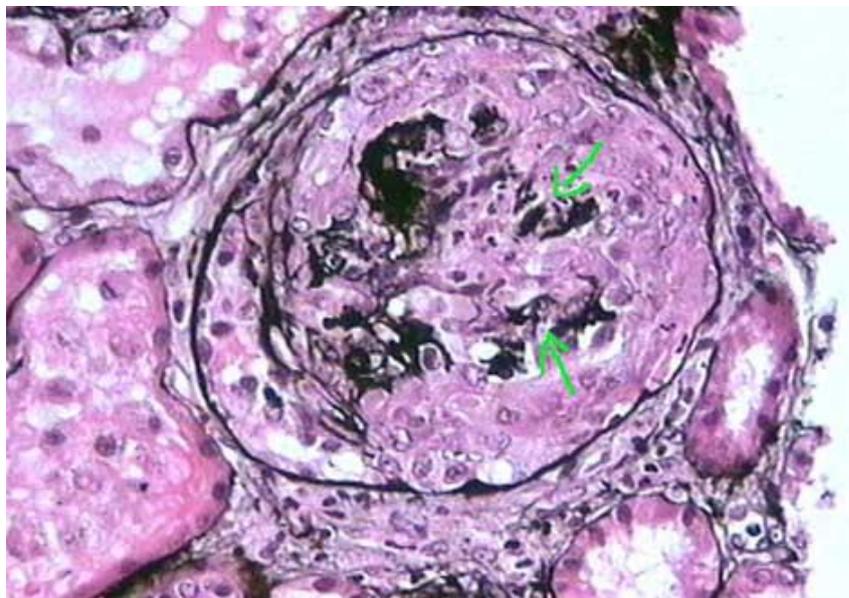
Bei der dritten Form der RPGN finden sich histologisch kaum Immunglobulinablagerungen (pauci-immunes Färbemuster) (Berden et al. 2010). Eine histopathologische Klassifizierung wurde jüngst zur besseren Unterscheidung des Schweregrads erstellt (Tabelle 1.2)

Klasse	Einschlusskriterien
Fokal	≥ 50% normale <i>Glomerula</i>
Halbmondbildung	≥ 50% <i>Glomerula</i> mit zellulären Halbmonden
Gemischt	< 50% normale, < 50% sklerotische < 50% <i>Glomerula</i> mit Halbmonden
Sklerotisch	≥ 50% komplett vernarbte <i>Glomerula</i>

Tab. 1.2 Klassifikation der ANCA-assoziierten *Glomerulonephritis* nach (Berden et al. 2010).

Die Veränderungen im *Glomerulum* einer an RPGN erkrankten Niere zeigen sich histologisch als Proliferat (Halbmonde oder „crescents“) aus parietalen Epithelzellen (55-95%) mit Monozyten/Makrophagen und T-Zell Akkumulation (15-35%) (Boucher et al. 1987; Lan et al. 1992; Ophascharoensuk et al. 1998) (Abb. 1.5). So ist bereits in den 1980er-Jahren erkannt worden, dass die parietale Epithelzelle in jedem Fall die bedeutendste Komponente bei der Bildung der Halbmonde ist (Guettier et al. 1986; Harrison and MacDonald 1986; Magil 1985). Mittlerweile gibt es kontroverse

Diskussionen über den Ursprung der Epithelzellen, die für die Bildung der „crescents“ verantwortlich sind (Singh et al. 2011). So rückten auch hier die Podozyten in den Forschungsfokus. Man fand heraus, dass sie „Zellbrücken“ zwischen Kapillarknäuel und Bowman-Kapsel bilden (Le Hir et al. 2001) und in die Bildung der Halbmonde involviert sind (Bariéty et al. 2005; Ding et al. 2006; Moeller 2004). Letztendlich konnten vor allem Smeets et al. mit Hilfe markierter Parietalzellen den Blick wieder auf diese lenken. So konnten sie zeigen, dass die PECs die „Zellbrücken“ als Antwort auf verschiedene Podozytopathien bilden, *de novo* den Migrations-/Aktivierungsmarker CD44 exprimieren und, wie bereits in den 1980er Jahren beschrieben, die größte Zellpopulation in den zellulären Halbmonden darstellen (Smeets et al. 2009a,b). Des Weiteren kommt es im Verlauf der RPGN zur Zerstörung des hochspezialisierten mikrovaskulären Netzwerks und teilweise zur Aufhebung der Integrität der Bowman'schen Kapsel. Dann können zusätzlich Fibroblasten und hämatopoetische Zellen in den Proliferaten detektiert werden. Auch das periglomeruläre Infiltrat ist typisch und besteht hauptsächlich aus aktivierten Makrophagen und T-Zellen. (Boucher et al. 1987; Heymann et al. 2009)



**Abb. 1.5: Klassische Histologie einer an RPGN erkrankten Niere.** *Glomerulum* mit typischem Halbmond (Methenamin-Silber-Färbung, 400fache Vergrößerung). Pfeile weisen auf die defekten Gefäßwände im Kapillarknäuel des *Glomerulum* (Abb. nach (Arias 2013)).

In einer jüngeren Studie konnte außerdem die Bedeutung des EGF-Rezeptors („epidermal growth-factor“-Rezeptor) für die Entstehung der RPGN und seine Inhibition als erfolgreiche Therapie gezeigt werden (Bollée et al. 2011).

Klinisch zeigt sich die RPGN mit unterschiedlichen Symptomen. Je nach Syndrom ist eine Beteiligung der Lunge, der Gefäße oder anderer Organsysteme festzustellen. Ein rascher Abfall der GFR ist allen Formen gemein und macht schnelles Handeln notwendig. Die jeweiligen Autoantikörper lassen sich im Serum detektieren. Letztendlich ist die Diagnose, äquivalent zur FSGS, aber nur histologisch zu stellen. Therapeutisch sind die Kortikosteroidpulstherapie und Cyclophosphamid bei allen Typen, zusätzlich Plasmapherese bei der anti-GBM *Nephritis*, Standard (Kuhlmann and Walb 2008).

## 1.2 DAS MAUSMODELL

### 1.2.1 DAS CRE/LOXP SYSTEM

Das Cre/Lox-P System wurde in den 1980er-Jahren entwickelt (Abremski et al. 1983; Abremski and Hoess 1984; Hoess et al. 1982; Sternberg et al. 1981). Es ist ein Rekombinationssystem, das der spezifischen Veränderung der DNA *in vivo* dient. Zunächst in Pflanzen genutzt, stellte man fest, dass das System auch in Säugetierzellen funktioniert (Sauer and Henderson 1988). So lassen sich mit Hilfe dieses Systems Gensequenzen in einer Gewebe- oder Zellart ausschneiden (Exzision = knock-out) oder überexprimieren (Inzision), ohne dass andere Gewebe davon betroffen sind. Ursprünglich stammt das Protein der Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 (Abremski and Hoess 1984). Das Enzym ist 38,5 kDa groß, gehört zur  $\lambda$ -Integrase-Familie der Rekombinasen und kommt in allen Organismen natürlich vor, wo es die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA zwischen spezifischen Basensequenzen katalysiert (Van Duyne 2001). Diese Basensequenz zur Erkennung der Cre-Rekombinase wird als loxP („locus of crossover of bacteriophage P“) bezeichnet und experimentell gezielt vor und hinter ein Gen gesetzt, das entfernt werden soll (sog. floxen „flanked by loxP sites“). Die loxP-Sequenz besteht aus zwei 14 bp großen, palindromen Rekombinase-Bindungselementen (RBEs), die invers um eine 6 bp große sog. Cross-over Region liegen (Abremski and Hoess 1985). Andere Quellen sprechen von 13 bp großen RBEs und einer 8 bp großen Spacer-Region (Mack et al. 1992). In jedem Fall ist die loxP-Sequenz 34 bp groß. Je zwei Cre-Rekombinase Moleküle binden

kovalent an eine loxP-Sequenz. Das Gen bzw. der DNA-Abschnitt, der zwischen zwei loxP Stellen liegt, wird herausgeschnitten, wenn die beiden loxP-Sequenzen gleich orientiert sind (Exzision, z.B. eines STOP-Codons). Nachfolgend werden die verbleibenden loxP-Enden fusioniert und der entstehende zirkuläre DNA-Abschnitt wird in der Zielzelle abgebaut (Sauer and Henderson, 1988; Van Duyne 2001).

Sind die beiden loxP-Sequenzen entgegengesetzt orientiert, katalysiert das Enzym die Inversion des geflochten Abschnittes, der um 180° gedreht im DNA-Strang verbleibt. Somit handelt es sich um einen irreversiblen Vorgang. Auch in der Säugerzelle funktioniert dieses System ohne Kofaktoren (Sternberg et al. 1981). Um eine Gewebespezifität herzustellen ist ein sog. Promotor wichtig. Der Promotor und die Cre-Rekombinase werden zusammen als Transgen in das Mausgenom eingebracht. Soll das Transgen, wie in der in dieser Arbeit charakterisierten Maus, nur in einer bestimmten Zelle der Niere exprimiert werden, wird ein für diese Zelle spezifisches Protein gesucht und der zugehörige Promotor (hier pPEC cPodxl1) (s. Kapitel 1.5) vor das Cre-Gen (Mauslinie 1) gesetzt. In einer zweiten Mauslinie muss das Gen, das ausgeschaltet werden soll, geflocht sein. Anschließend werden Mauslinie 1 und 2 verpaart. Einige Tiere aus der Filialgeneration tragen dann beide Veränderungen im Erbgut. (Orban et al. 1992)

Die Einfachheit des Cre/loxP-Systems sorgte für eine weit verbreitete Nutzung dieses Systems als Werkzeug für die DNA-Manipulation *in vitro* und *in vivo* (Sauer 1993).

### 1.2.2 DAS TET-ON SYSTEM

Ein Nachteil der Promotoren, die für das Funktionieren des Cre/loxP Systems notwendig sind, ist die mögliche Aktivierung bereits in der Embryonalphase. Dadurch kann es unter Umständen zu Defekten in der Entwicklung oder sogar zum Tod des Embryos kommen. Gewebespezifische Promotoren sind eine Möglichkeit diese Risiken zu minimieren. Um auch eine zeitliche Kontrolle über die Expression oder Deletion eines Gens zu bekommen, wurden induzierbare Systeme entwickelt. So vermeidet man die Probleme, die durch die genetische Modifikation in der Embryonalphase auftreten können.

Zunächst wurde versucht die Expression durch verschiedene induzierbare eukaryotische Promotoren zu steuern, die z.B. von Schwermetallionen (Brinster et al. 1982; Mayo et al. 1982) oder Hormonen reguliert wurden (Klock et al. 1987; Lee et al. 1981). Diese Versuche scheiterten jedoch an der „leakiness“ der Promotoren im inaktiven Stadium, also daran, dass die Promotoren auch ohne Induktion eine Basalaktivität zeigten.

In Heidelberg wurde dann das mittlerweile häufig eingesetzte Tetrazyklin-regulierte System (Tet-On/Off System) entwickelt (Gossen et al. 1995; Gossen and Bujard 1992). Dieses System macht sich das natürlicherweise in Gram-negativen Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) exprimierte TetA-Protein zu Nutze. Dabei handelt es sich um einen Protonen-Antiporter, der in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist (Yamaguchi et al. 1990). Die Transkription dieses Proteins wird vom TetR („tc-responsive tet-repressor“) reguliert und sorgt für die Tetrazyklinresistenz dieser Bakterien. Wenn Tetrazyklin nun in ein solches Bakterium eindringt, bindet das TetR daran und es kommt zu einer Konformationsänderung des Repressors. Durch diese Konformationsänderung löst er sich vom TetO („tetracyclin operator sequence“) (Bockamp et al. 2002), an die er in Abwesenheit des Tetrazyklins gebunden ist. Daraufhin kommt es zu einer raschen Abnahme der zytoplasmatischen Tetrazyklinkonzentration, die dazu führt, dass die Expression der beiden Gene wieder abnimmt (Berens and Hillen 2003). So stellt dieses System einen idealen Regulator für die Transkription auch in eukaryotischen Zellen dar. Da das unmodifizierte TetR aber in Säugetierzellen nicht effizient genug ist, wird ein zusätzlicher Regulator genutzt (Yao et al. 1998). Bei dem Tet-Off System ist dieser Regulator eine Fusion aus dem TetR und einer eukaryotischen Aktivierungsdomäne (z.B. die VP16-Transaktivierungsdomäne des *Herpes simplex*). Er wird als tTA = „tetracycline transactivator“ bezeichnet. Dieser Transaktivator regelt die Bindung an einen Tetrazyklin-abhängigen Promotor, der sieben Wiederholungen des TetO Elements des *Escherichia coli* Transposons T<sub>10</sub> enthält. Der Promotor wird auch als TRE („tetracyclin responsive element“) bezeichnet. Dieser TRE-Promotor wird mit einem anderen Promotor fusioniert, der z.B. vom humanen Cytomegalievirus stammt oder *in vivo* häufig einen gewebespezifischen Promotor darstellt, der für die räumliche Begrenzung der Expression sorgt (Berens and Hillen 2003; Saam and Gordon 1999). Wenn dieser „Hybridpromotor“ stabil in die Säugetier-DNA eingebaut ist, ist dessen

Transkription schon bei  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  Tetrazyklin (i.d.R. Doxyzyklin) ausgeschaltet (Berens and Hillen 2003; Gossen and Bujard 1992). Anders ist es beim Tet-On System. Hier regelt an Stelle des Transaktivators ein Repressor, nämlich der rtTA („reverse tetracycline transactivator“) die Bindung an den Promotor. So wird hier nach Tetrazyklingabe die Transkription angeschaltet (Zhu et al. 2002). Da der rtTA relativ wenig sensitiv auf die Doxyzyklingabe reagiert, wurde ein verbesserter Transaktivator (rtTA-M2) entwickelt, der 10-fach sensitiver und zusätzlich stabiler ist (Urlinger et al. 2000).

Wird nun die oben beschriebene Cre-Rekombinase durch den TRE-Promotor reguliert, so lassen sich beide Systeme kombinieren (Saam and Gordon 1999). Im Falle der in dieser Arbeit vorgestellten Maus kann so durch Gabe eines Tetrazyklins (in diesem Fall Doxyzyklin) die Expression der Cre-Rekombinase induziert werden. Der Promotor kann sogar bidirektional sein, so dass gleichzeitig zwei Gene Tetrazyklin-abhängig exprimiert werden (Baron et al 1995).

Eine andere, viel genutzte Möglichkeit der Expressionskontrolle stellt die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors dar. So kann nur durch Gabe von Tamoxifen die Cre-Rekombinase in den Zellkern gelangen und aktiv werden (Metzger and Chambon 2001).

### 1.2.3 REPORTERGENE

Die Überwachung der Transkription von Genen durch Kopplung dieser Gene an sog. Reportergene ist weit verbreitet. Das Prinzip ist einfach: Das Reportergen wird an eine regulatorische Sequenz eines Gens gebunden und, wenn es zur Veränderung der Expression kommt, sorgt diese Sequenz für den „Output“ eines leicht messbaren Signals. So kann die Aktivität dieses Gens nachgewiesen werden (Wood 1995).

Für die in dieser Arbeit vorgestellte Maus wurden zwei der am weitesten verbreiteten Reportergene genutzt. Das erste, hier verwendete Reportergen ist das LacZ Gen aus *Escherichia coli*, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert (Lis et al. 1983). In den Bakterien ist die  $\beta$ -Galaktosidase verantwortlich für die Hydrolyse von Laktose in Glukose und Galaktose. Da dieses Enzym aber auch andere Substrate hydrolysieren kann, wie z.B 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-gal), können so, nach

Aktivierung des LacZ Gens, farbige (in diesem Fall blaue) Präzipitate in den Zellen nachgewiesen werden (Ghim et al. 2010). Das zweite Reporter-gen ist das GFP-Gen („green fluorescent protein“) das erstmals aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Morin and Hastings 1971). Erst später konnte dieses Gen vervielfältigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl in prokaryoten als auch in eukaryoten Zellen funktionell ist (Chalfie et al. 1994). Die Luciferase ist ebenfalls ein solches Reporter-gen. Besonders die Luciferase des Glühwürmchens (lat. *Lampyridae*) wird häufig genutzt (de Wet et al. 1985). Dieses Enzym ist deshalb so beliebt, weil es schnell aktiv ist und für seine Verwendung keine post-translationalen Modifikationen erforderlich sind (Ghim et al. 2010). Die Kombination der Synthese verschiedener Systeme macht es nun möglich, einen bestimmten Phänotyp *in vivo* zu generieren (Guet et al. 2002). So kann z.B. Tetrazyklin-induziert über einen bidirektionalen Promotor die Cre-Rekombinase Luciferase-abhängig exprimiert werden und so ein zwischen zwei loxP-Stellen liegendes STOP-Codon ausschneiden, was dann zur Expression der  $\beta$ -Galaktosidase führt, wie bei der LC1-ROSA26-Mauslinie beschrieben (Schönig et al. 2002; Soriano 1999).

#### 1.2.4 DITPHTHERIETOXIN

Das 1884 von Friedrich Loeffler erstmals isolierte *Corynebakterium diphtheriae* exprimiert das Diphtherietoxin. Es ist ein Exotoxin und gehört zur Gruppe der Lektine. Das Toxin besteht aus zwei Proteinketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das erste Polypeptid repräsentiert die A-Kette, ist 21 kDa groß sowie N-terminal positioniert und stellt die C-Domäne mit katalytischen Eigenschaften (C für *catalytic*) dar. Das zweite Polypeptid repräsentiert die B-Kette, ist 37 kDa groß und C-terminal. Es beinhaltet die T- und die R-Domänen und ist verantwortlich für die Translokation und die Rezeptorbindung (Choe et al. 1992; Collier and Kandel 1971; Collier 2001).

Beide Polypeptide müssen durch proteolytische Spaltung voneinander getrennt werden, um enzymatisch aktiv zu werden. Diese Spaltung geschieht an der Sequenz R-190-VRR-193, die in den Disulfidbrücken lokalisiert ist (Gordon and Leppla 1994). Die B-Kette des intakten Toxins bindet zunächst an Vorläufer des HB-EGF-Rezeptors

(„heparin binding epidermal growth factor“) (Mitamura et al. 1995; Naglich et al. 1992). Danach wird das Toxin über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle eingeschleust und über Endosomen ins Zytosol gebracht. Durch den sauren pH in diesen Endosomen wird die A-Kette (DTA) freigesetzt (Pappenheimer 1977; Sandvig and Olsnes 1981) und hemmt nachfolgend die Proteinsynthese, wie bereits 1959 beschrieben (Strauss and Hendee 1959; Strauss 1960). Diese Hemmung erfolgt am Elongationsfaktor 2 (EF-2), der ebenfalls schon früh als DT-sensitives Element der eukaryotischen Zelle identifiziert werden konnte (Collier 1967). Das Toxin katalysiert im Zytosol die ADP-Ribosylierung des EF-2, wobei der ADP-Ribose-Anteil des NAD<sup>+</sup> (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) auf einen veränderten Histidinrest (sog. Diphthamid) des Elongationsfaktors 2 übertragen wird und diesen inaktiviert. Daraufhin kommt es zur Hemmung der Translation und somit zum Zelltod (Honjo et al. 1968). Einmal in der Zelle, reicht ein einziges Molekül DTA, um die Zelle zu töten (Yamaizumi et al. 1978). Wie bereits in anderen Tiermodellen gezeigt (Clarke et al. 2006; Lahl et al. 2007; Miyake et al. 2007), wurde auch in der hier verwendeten Maus nur eine attenuierte A-Kette (DTA 176) zur Überexpression gebracht (Maxwell et al. 1987). Das hat den Vorteil, dass nach der Ablation der Zielzellen die A-Kette alleine nicht in andere Zellen eindringen kann. Ein weiterer Vorteil des Diphtherietoxins ist, dass Nagetiere natürlicherweise resistent sind (Collier 2001).

### 1.2.5 DAS MODELL: PEC-ABLATION DURCH SPEZIFISCHE EXPRESSION VON DTA

Bei dem für diese Arbeit verwendeten Tiermodell handelt es sich um vierfach transgene PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Mäuse. Die Mäuse wurden generiert, indem die PEC-rtTA/LC1-Maus (Appel et al. 2009) mit der ROSA<sup>DTA176</sup>-Maus verpaart wurde (Wu et al. 2006) (Abb. 1.6 A).

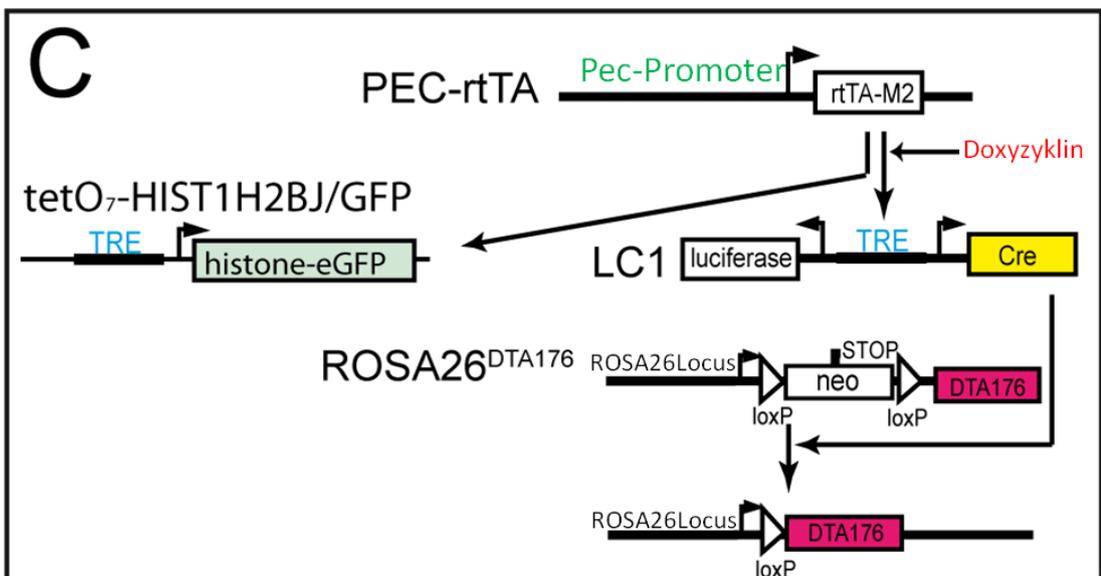
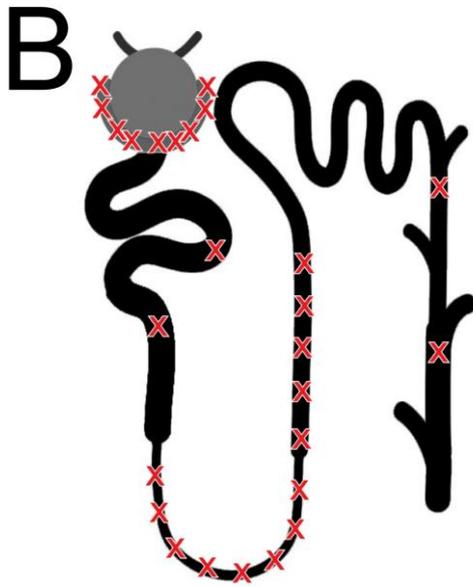
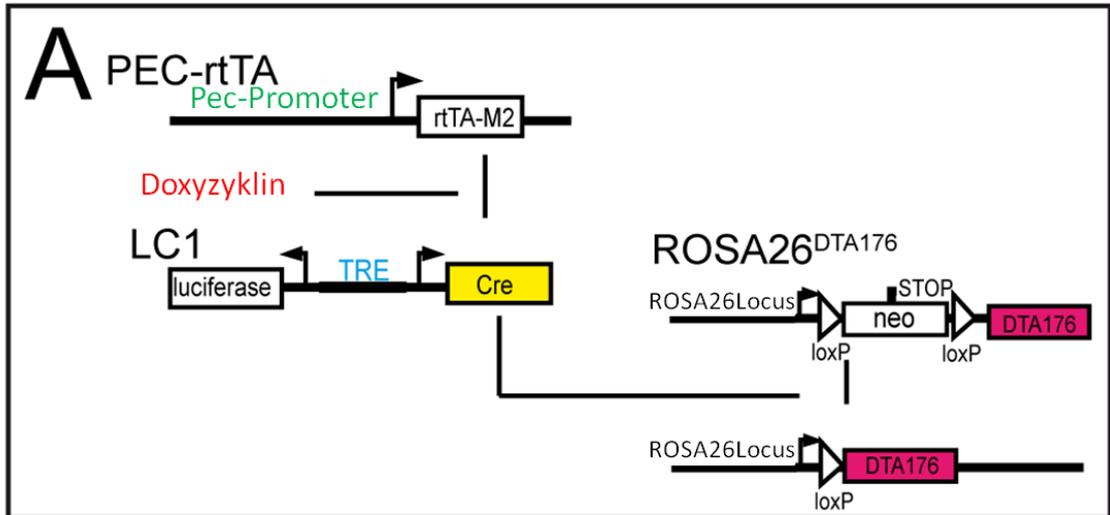
Die von Appel et al. generierte Maus ist in der Lage, Parietalzellen (PECs) mit Hilfe eines für diese spezifischen Promotors genetisch zu markieren. Drei kb des humanen Podocalyxin-Gens (*hPODXL1*) und 0,3 kb des Kaninchen-*Podxl1* werden dazu genutzt, das Kaninchen-Podocalyxin in den transgenen Mäusen zu exprimieren. Dieser zusammengesetzte Promotor wird pPEC cPodxl1 genannt (Appel et al. 2009). Um das

System induzierbar zu machen, wird unter diesem parietalzellspezifischen Promotor der Transaktivator rtTA-M2 exprimiert (Urlinger et al. 2000). Die zunächst doppelt transgenen Mäuse werden dann mit LC1/Rosa26 Mäusen verpaart. Das LC1-Transgen exprimiert reversibel die Cre-Recombinase unter der Kontrolle des induzierbaren TRE-Promotors (Tet-On) (Schönig et al. 2002). Die Cre-Rekombinase schneidet darauf folgend im ubiquitären, endogenen ROSA26-Locus (Soriano 1999) eine loxP-flankierte STOP-Kassette aus, so dass  $\beta$ -Galaktosidase irreversibel in den Zielzellen exprimiert wird. In diesen tripel-transgenen Mäusen sind nach 14 Tagen Doxyzyklinbehandlung ca. 72% der Parietalzellen genetisch markiert. Aber auch im Tubulussystem kann eine Aktivität des Promotors nachgewiesen werden, insbesondere im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (Abb. 1.6 B) (Appel et al. 2009). Die Maus von Wu et al. exprimiert auf dem ubiquitären ROSA26-Locus ein attenuiertes Diphtherietoxin (DTA176), also lediglich das A-Fragment dieses Toxins, unter einem Promotor, der in diesem Fall spezifisch ist für Oligodendrozyten (Wu et al. 2006).

Durch gezielte Verpaarung dieser beiden Mauslinien wurde so die PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Maus generiert. In dieser Maus ist es erstmals möglich induzierbar Parietalzellen zu auferieren. Nach Doxyzyklinbehandlung wird unter dem parietalzellspezifischen Promotor (pPEC cPodxl1) die Cre-Rekombinase aktiv, die ein STOP-Codon ausschneidet, so dass das A-Fragment des Diphtherietoxins exprimiert wird, das durch Hemmung der Translation die Parietalzellen tötet.

Für weitere Experimente wurde ein fünftes Transgen in die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere eingebracht, das tetO<sub>7</sub>-HIST1H2BJ/GFP. Dieses Konstrukt exprimiert Histon-gekoppelt ein „enhanced“ GFP (eGFP). So wird zusätzlich Tetrazyklin-abhängig unter der Kontrolle des Parietalzell-spezifischen Promotors ein grün fluoreszierendes Protein exprimiert (Tumbar et al. 2008). (Abb. 1.6 C)

Um die Bedeutung der Parietalzellen in der Entstehung der FSGS zu überprüfen, wurde außerdem die vierfach transgene PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Maus mit der Thy 1.1-Maus verpaart (Kollias et al. 1987; Smeets et al. 2003). In dem Thy 1.1-Mausmodell werden ektopisch Thy 1.1-Antigene spezifisch auf Podozyten exprimiert, so dass nach Injektion eines Thy 1.1-Antikörpers (19XE5: Unterklasse IgG3) akut die Fußfortsätze verschmelzen und eine Proteinurie entsteht. Ungefähr 7 Tage nach der Injektion des Antikörpers ist histologisch eine deutliche FSGS sichtbar.



**Abb. 1.6: Schema der Transgene der für diese Arbeit verwendeten Mäuse. (A)** Schema des Transgens für die Parietalzellablation. Der reverse Tetrazyklin-induzierbare Transaktivator (PEC-rtTA) wird in den **Parietalzellen** exprimiert (**PEC-Promotor**). Nach **Doxyzyklingabe** wird durch Aktivierung des **Tetrazyklin-abhängigen Promotors (TRE)** die **Cre-Rekombinase** transient vom zweiten Transgen (LC1) exprimiert. Nun schneidet die **Cre-Rekombinase** ein hinter dem ubiquitären Rosa26locus liegendes STOP-Codon aus, das zwischen 2 loxP Stellen liegt, so dass nun die Expression eines abgeschwächten **Diphtheritoxins (DTA176)** aktiviert wird, was den Tod der PECs zur Folge hat (außerdem wird unter dem gleichen Promotor auf dem gleichen ROSA26-Locus Lac-Z exprimiert, nicht gezeigt).

**(B)** Schema der erwarteten Zellablation im Nephron. Der Transaktivator ist vor allem aktiv in PECs, aber auch im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (**rote x**). Vereinzelt Zellen im proximalen Tubulus und Sammelrohr sind ebenfalls betroffen.

**(C)** In einer zweiten Maus wurde zusätzlich ein weiteres Transgen eingefügt. Unter dem gleichen **PEC-Promotor** wird nach Doxyzyklingabe zusätzlich ein **eGFP (grün fluoreszierendes Protein)** in den PECs exprimiert.

rtTA-M2= verbesserter Tetrazyklin-induzierbarer Transaktivator „loxP = locus of crossover of bacteriophage P“

### 1.3 ZIEL DER ARBEIT

Da die mit einer Epithelzellproliferation einhergehenden glomerulären Erkrankungen immer noch häufig in der Dialysepflicht münden und die Bedeutung der parietalen Epithelzellen, gerade im Hinblick auf die Entstehung der FSGS und der RPGN, noch weitgehend unerforscht ist, soll in dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung der parietalen Epithelzellen des *Glomerulum* (PEC) untersucht werden. Da PECs diejenigen Zellen darstellen, welche im Rahmen der genannten Erkrankungen aktiv proliferieren, sind sie möglicherweise auch therapeutisch bedeutsam. In der vorliegenden Arbeit wird somit erstmals ein spezifisches Ablationsmodell für Parietalzellen vorgestellt.

Im Wesentlichen sollten die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Charakterisierung der PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Mauslinie. Ist es möglich, spezifisch Parietalzellen zu auferieren und falls ja, wie effizient ist das System?
2. Hat die Ablation Auswirkungen auf die Filtrationseigenschaften des *Glomerulum*?
3. Welche Veränderungen zeigen die *Glomerula* in der akuten Ablationsphase und nach Beendigung der Doxyzyklinbehandlung? Kommt es zur Regeneration?
4. Lässt sich auch „ohne“ Parietalzellen eine FSGS induzieren?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 VERSUCHSTIERE

Das Versuchsvorhaben wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Köln genehmigt („Genetische Ablation glomerulärer parietaler Epithelzellen“).

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Versuche mit den vierfach transgenen PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Mäusen durchgeführt, die nach Induktion spezifisch in Parietalzellen die A-Kette des Diphtherietoxins (DTA) exprimieren (s. Punkt 1.2.5). Da das LacZ und das DTA auf dem gleichen ROSA26-Locus exprimiert werden, waren die verwendeten, vierfach transgenen Tiere für das LacZ und das DTA immer heterozygot. Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse (*Mus musculus*) verwendet. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 12 Wochen alt, bei einem Gewicht von 20-25g. Sie wurden in der Tierhaltung des Instituts für Versuchstierkunde des Uniklinikums der RWTH Aachen unter SPF-Bedingungen gezüchtet. Die Mäuse wurden in standardisierten Kunststoffkäfigen der Firma Tecniplast auf Streu gehalten. Während der Aufzucht hatten die Tiere unbegrenzt Zugang zu frischem Wasser und die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse der Firma ssniff, Soest. Tag- und Nachtzyklus betragen jeweils 12 h. Die Raumtemperatur lag bei 22 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 55-65%.

## 2.1.2 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Einbettautomat (MTM)	Slee, Mainz
ELISA Reader, Sunrise	Tecan, Männedorf
Färbekammer	Roth Carl GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Flachbettlegeapparatur Sub-cell GT	Bio-Rad, Hercules, USA
Gefriermikrotom (Leica CM3050S)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Geldokumentationsgerät, Dark Hood DH-40/50	Biostep, Jahnsdorf
Geldokumentationssystem Felix 1040	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Biberach an der Riss
Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Metabolismuskäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Mikroskop, Leica DMRX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowellenherd	Bosch, Stuttgart
NuPage Novex Elektrophorese-System	Invitrogen, Darmstadt
Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipetten Akku, Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenleser	Tecan, Männedorf, Schweiz
Rotationsmikrotom (Leica RM2145)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Thermocycler, T3	Biometra, Jena
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, München
VITROS Chemistry System	Ortho Clinical Diagnostics, New York, USA

Vortex-genie 2	Scientific Industrie, New York, USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Zentrifuge für Falcons, Multifuge 3 L-R	Heraeus, Düsseldorf

**Tab. 2.1: Verwendete Geräte.**

### 2.1.3 VERBRAUCHSMATERIAL

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Thermo Scientific, Braunschweig
Einbettform für Gewebe Cryo/Paraffin	Sakura, Torrance, USA
Einmalhandschuhe, powder free	Sempercare, Wien, Österreich
Einmalwiegeschälchen	VWR International GmbH, Langenfeld
Falcons 15 ml	Nerbeplus, Winsen
Falcons 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glaspipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Gradientengele, Bis-Tris 4-12%	Invitrogen, Darmstadt
Kanülen, BD Microlance™	Becton Dickinson, Madrid Spanien
Kryo-Röhrchen, Cryovial®, 2 ml	Simport, Bernard-Pilon, Kanada
Mikrotomklingen	Microm, Walldorf
Mikrotiterplatte, 96 well	Bethyl, Montgomery, USA
Objektträger, Superfrost Plus®	Thermo Scientific, Braunschweig
Operationsbesteck	Aesculap AG, Tuttlingen
Original Perfusor-Spritze®, 50 ml	Braun, Melsungen
PCR-Tubes, Safelock	VWR International GmbH, Langenfeld
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Skalpel, Feather Disposable Scalpel No 15	Feather Safety Razor Co LTD, Osaka, Japan
Spritzen 1 ml, BD Plastipak™	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg

**Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial.**

#### 2.1.4 CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Invitrogen, Carlsbad, USA
Coomassie-Färbelösung SimplyBlue™ Safe Stain	Invitrogen, Carlsbad, USA
DMF (N,N Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-ladder 100 bp	New England Biolabs, Schwalbach
Doxyzyklin	Fagron GmbH und Co KG, Barsbüttel
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100%)	Merck Darmstadt
Ethanol	Schmittmann GmbH, Düsseldorf
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd Lösung 4%	Fischar, Saarbrücken
Glutaraldehyd 25%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Invitrogen, Carlsbad, USA

Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gold-markiertes BSA, Tracer Ultra Small	Aurion, Wageningen, Niederlande
Hämatoxylin	Roth Carl, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immu-Mount™	Thermo-Scientific, Braunschweig
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lysepuffer DirectPCR (Tail)	Viagen, Erlangen
Magnesiumchlorid	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	VWR International GmbH, Langenfeld
Methylgrün	Sigma-Aldrich, Steinheim
MOPS SDS Running Buffer (20x) NuPage®	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natrium-Tetraborat	Merck, Darmstadt
Natrium-Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Cacodylat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl) Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nonidet P40 (NP40)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin	SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Tabletten	GIBCO, Paisley, UK
Perjodsäure	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti® Histokitt	Roth, Karlsruhe

Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flüssigstickstoff	über Apotheke des UK Aachen
Tissue Tek®O.C.T™ Compound	Sakura, Alphen an den Rijn Niederlande
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	AppliChem, Darmstadt
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot (Heidelberg)
Xylol	Fischar, Saarbrücken

**Tab. 2.3: Benutzte Chemikalien.**

### 2.1.5 LÖSUNGEN UND PUFFER

#### TBST

Komponente	Volumen/Menge
Stocklösung A	
7,7 mM Tris-HCl	12,14 g
150 mM NaCl	87,66 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Arbeitslösung	
Stocklösung A	100 ml
Tween 20	0,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml

**Tab. 2.4: Rezept für TBST.**

## ½ Karnovsky

Komponente	Volumen/Menge
Stock A:	
Na-Cacodylat-Puffer (0,2 M) pH 7,4	
Na-Cacodylat	8,56 g
ddH <sub>2</sub> O	200 ml
Stock B:	
10% Paraformaldehyd	
Paraformaldehyd	10 g
ddH <sub>2</sub> O	90 ml
NaOH	einige Tropfen
auf 60 °C erwärmen, pH 7,2-7,4 einstellen	
Arbeitslösung	
Stock A	100 ml
Stock B	40 ml
Glutaraldehyd 25%	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	50 ml

**Tab. 2.5: Herstellung von ½ Karnovsky für die Gewebefixierung (TEM).**

## Methylgrün (pH 4,2)

Komponente	Volumen/Menge
Methylgrün	20 g
0,1 M Essigsäure	735 ml
0,1 M Na-Acetat	265 ml

**Tab. 2.6: Herstellung von Methylgrün für die Immunhistochemie.**

## 50x TAE Puffer

Komponente	Volumen/Menge
Tris-Base	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 2.7: Herstellung von 50x TAE Puffer für die Gelelektrophorese.**

## Post Fix

Komponente	Volumen/Menge
Glutaraldehyd	8 ml
MgCl 1M	100 µl
SDS 10%	100 µl
NP40 70%	20 µl
PBS	ad 100 ml

**Tab. 2.8: Herstellung von Post Fix für die Behandlung von Kryoschnitten.**

## Perfusionslösung 3% PFA

Komponente	Volumen/Menge
ddH <sub>2</sub> O	900 ml erwärmen
PFA	30 g
10 N NaOH	bis Lsg. klar
10x PBS	100 ml

**Tab. 2.9: Ansatz der Perfusionslösung für die Gewebefixierung.**

## 5x Sample Buffer nach Laemmli

Komponente	Volumen/Menge
Tris-HCL, pH 6,8, 1 M	6 ml
SDS	1 g
Glycerin	7 ml
Bromphenolblau	ca.10 mg
ddH <sub>2</sub> O	5,5 ml
β-Mercaptoethanol	10%

**Tab. 2.10: Herstellung von 5x Puffer nach Laemmli für SDS-Gele.**

## Transferpuffer für SDS Gele

Komponente	Volumen/Menge
Stocklösung A	
25 mM Tris-Base	30,25 g
195 mM Glycin	144 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
Arbeitslösung	
Stocklösung A	100 ml
Methanol	200 ml
ddH <sub>2</sub> O	700 ml

**Tab. 2.11: Herstellung des Transferpuffers für die SDS-Gele.**

## X-Gal

Komponente	Volumen/Menge
Stocklösung A	
X-Gal	25 mg
DMF	1 ml
Arbeitslösung	
Stocklösung A	400 µl
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 0,5 M	100 µl
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 0,5 M	100 µl
MgCl <sub>2</sub> 1 M	20 µl
SDS 10%	10 µl
NP40 70%	2 µl
PBS	ad 10 ml

**Tab. 2.12: Rezept für die X-Gal-Färbelösung.**

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Boratpuffer	15,2 g Natrium-Tetraborat in 400 ml ddH <sub>2</sub> O
ddH <sub>2</sub> O, Ampuwa	kommerziell über Firma Fresenius Kabi, Bad Homburg
Demaskierungspuffer	2 ml Antigen Unmasking Solution in 198 ml ddH <sub>2</sub> O
dNTP's	Desoxynukleosidtriphosphat-Set, Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3%	20 ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 180 ml ddH <sub>2</sub> O
Hämalaunlösung sauer, nach Meyer	kommerziell über Roth, Karlsruhe
Hoechst-Färbelösung	10 mg Hoechst 33258 in 10 ml ddH <sub>2</sub> O
Isotonische Kochsalzlösung	0,9%, kommerziell über B. Braun, Melsungen

Laufpuffer für SDS Gele	25 ml 20x MOPS-Puffer in 475 ml ddH <sub>2</sub> O
Lyse Puffer für tails	190 µl Direct PCR lysis reagent über Viagen, Erlangen + 10 µl Proteinase K (4 mg/ml)
PCR Reaktionspuffer	10x Puffer für Fire Taq Polymerase, Steinbrenner, Wiesebach
Perjodsäure 2%	2 g Perjodsäure in 100 ml ddH <sub>2</sub> O
Schiffs Reagenz	kommerziell über Firma Merck, Darmstadt

**Tab. 2.13: Lösungen und Puffer.**

## 2.1.6 ANTIKÖRPER

Für die *in vivo* Experimente mit den Thy 1.1-Mäusen wurde ein Maus-anti-Maus Thy 1.1 Antikörper benutzt (19XE5: subclass IgG3). Dieser Antikörper wurde von der Nematologie-Abteilung der Agriculture University Wageningen, Niederlande, hergestellt (Lostrom et al. 1979).

### 2.1.6.1 ERSTANTI KÖRPER

Spezifität	Klon	Wirtsspezies	Hersteller
CD3	Klon 145-2Cl	Hamster	BD Biosciences Pharmingen
CD86	Klon GL1	Ratte	eBiosciences, Frankfurt
MHCII	Klon 25-9-17	Maus	BioLegend, Aachen
CD11b	polyklonal	Ratte	eBiosciences, Frankfurt

**Tab. 2.14: Erstantikörper für die Immunfluoreszenz der periglomerulären Infiltrate.** Durchgeführt von Prof. Christian Kurts, Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn. Bei allen hier angegebenen Antikörpern handelt es sich um Maus-spezifische Antigene.

Spezifität	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
Albumin	Ziege	1:1000	Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, USA
BrdU	Maus	1:200	Milipore Corp, Billerica, USA
CD44	Ratte	1:100	BD, Biosciences, Mannheim
Claudin-1	Kaninchen	1:50	Abcam, Cambridge, UK
Desmin	Maus	1:500	Dako A/S, Glostrup, Dänemark
eGFP	Maus	1:100	Clontech Laboratories, Mountain View USA
Megalin	Meerschweinchen	1:250	Santa Cruz Bioetchnology, St. Cruz, USA
Pax-8	Ziege	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Podocin	Kaninchen	1:100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
THP	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotechnology, St. Cruz, USA
WT-1	Kaninchen	1:50	Santa Cruz Biotechnology, St. Cruz, USA

**Tab. 2.15: Erstantikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.** Bei allen hier angegebenen Antikörpern handelt es sich um Maus-spezifische Antigene

### 2.1.6.2 LEKTINE

Spezifität	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
LTA	<i>Lotus tetragonulobus</i>	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, USA

**Tab. 2.16: Lektin**

## 2.1.6.3 ZWEITANTIKÖRPER

Spezifität	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
Dye-light 488, anti-Kaninchen IgG	Esel	1:200	Dianova Immundiagnostik, Hamburg
Dye-light 488 anti-Maus IgG	Esel	1:200	Dianova Immundiagnostik, Hamburg
Dye-light 549 anti-Ratte IgG	Esel	1:200	Dianova Immundiagnostik, Hamburg
Dye-light 549 anti-Kaninchen IgG	Esel	1:200	Dianova Immundiagnostik, Hamburg
Dye-light 549,anti-Maus IgG	Esel	1:200	Dianova Immundiagnostik, Hamburg
anti-Ziege IgG, biotinyliert	Pferd	1:300	Vector Laboratories, Burlingame, USA
anti-Meerschweinchen IgG, biotinyliert	Ziege	1:250	Vector Laboratories, Burlingame, USA
anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Pferd	1:350	Vector Laboratories, Burlingame, USA

**Tab. 2.17: Zweitantikörper**

## 2.1.7 KOMMERZIELLE KITS

Kit	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DAB Peroxidase Substat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Apop Tag® Plus In Situ Apoptosis Fluorescin Detection Kit	Chemicon International, Inc., Temecula, USA

Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
--------------------------------------	-------------------------

<b>Tab. 2.18: Kommerzielle Kits, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.</b>
---

### 2.1.8 OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)

Alle hier genannten Primer wurden über die Firma Invitrogen, Darmstadt bezogen.

Primer DTA	Sequenz
DTA 1	GTTATCAGTAAGGGAGCTGCAGTGG
DTA 2	AAGACCGCGAAGAGTTTGTCTC
DTA 3	GGCGGATCACAAGCAATAATAACC

Primerpaar Cre	Sequenz
Cre.fwd	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
Cre.rev	GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG

Primerpaar TET-On	Sequenz
rtTA.fwd	AATCGAGATGCTGGACAGGCATCATACCCA
rtTA.rev	GGCATAGAATCGGTGGTAGGTGTCTCTCTT

Primerpaar LacZ	Sequenz
LacZ.fwd	TTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA
LAcZ.rev	ATGTGAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCT

Primerpaar Thy 1.1	Sequenz
Thy 1.1 fwd.	CGCCTGAGTCCTGATCTCC
Thy 1.1 rev.	AACCTGCATCTTCACTGGGT
APA-fwd.	ACACAACCCCAGCTCCTTCC
APA-rev.	TCTTCTGCAGCCTGGATCAC

Die PCR für die Aminopeptidase A (APA-fwd./APA-rev.) dient als interne Positivkontrolle.

Primerpaar e-GFP	Sequenz
e-GFP.1	GGTCTTG TAGTTGCCGTCGT
e-GFP.2	CCTGAAGTTCATCTGCACCA

**Tab. 2.19 Primerpaare für die Genotypisierungen**

### 2.1.9 ENZYME

Enzym	Hersteller
Fire Taq Polymerase	Steinbrenner, Wiesenbach
Proteinase K 4 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tab. 2.20 Eingesetzte Enzyme**

### 2.1.10 NARKOTIKA

Mittel	Hersteller
Isofluran Forene®	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Ketamin 10%	Ceva Sante Animale, Düsseldorf
Xylazin 2%	Medistar GmbH, Bernburg

**Tab. 2.21 Narkotika für die Arbeit mit den Mäusen.**

### 2.1.11 SOFTWARE

Software	Hersteller
Excel 2007	Microsoft, Redmond, USA
Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Photoshop CS3	Adobe, San Jose, USA
Illustrator CS4	Adobe, San Jose, USA

**Tab. 2.22 Software** , die zur Bearbeitung der Bilder und der Erstellung der Grafiken verwendet wurde.

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 GENOTYPISIERUNG

Zur Genotypisierung wurden den Mäusen im Alter von drei Wochen eine ca. 5 mm große Schwanzbiopsie entnommen.

#### 2.2.1.1 GEWINNUNG VON GENOMISCHER DNA AUS SCHWANZBIOPSIEN

Die gewonnenen Schwanzbiopsien wurden in 200 µl Lysepuffer (190 µl Viagen direct PCR lysis reagent und 10 µl Proteinase K (4 mg/ml)) über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben kurz (ca. 5 sec) bei 21°C und 13.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge fresco, Thermofischer Scientific) um die nicht lysierten Bestandteile zu sedimentieren. Danach wurden die Lysate für 45 min bei 85°C im Heizblock geschüttelt, um die Enzymaktivität der Proteinase K zu stoppen. Zum Schluss wurde nochmals kurz zentrifugiert und die Proben waren bereit für den Einsatz in der PCR. Die Lagerung fand kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C statt.

### 2.2.1.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, bei der man mithilfe eines Enzyms die DNA *in vitro* vervielfältigen kann (Saiki et al. 1985, 1988). Das DNA-replizierende Enzym, die DNA-Polymerase, ist in der Lage, einen DNA-Strang komplementär zu einem gegebenen Strang zu synthetisieren. Dazu benötigt sie mindestens zwei spezifische, synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sog. Primer, die auf den beiden Einzelsträngen der DNA das zu amplifizierende Stück flankieren. Heutzutage verwendet man häufig die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammende sog. Taq-Polymerase, die sich dadurch auszeichnet, außerordentlich hitzestabil zu sein (Chien et al. 1976). So kann man die Reaktion automatisiert in sog. Thermocyclern ablaufen lassen.

Ein Reaktionsansatz am Beispiel der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten DTA PCR

---

- 2,5 µl 10x-Reaktionspuffer
  - 0,2 µl dNTPs (Desoxyribonukleotidlösung, 25 mM)
  - Je 2 µl der drei Primer (10 µM)
  - 0,4 µl Fire Taq-Polymerase
  - 2 µl DNA
  - 13,9 µl ddH<sub>2</sub>O
- 

Gesamtvolumen: 25 µl

Ein PCR Zyklus am Beispiel der hier verwendeten DTA PCR:

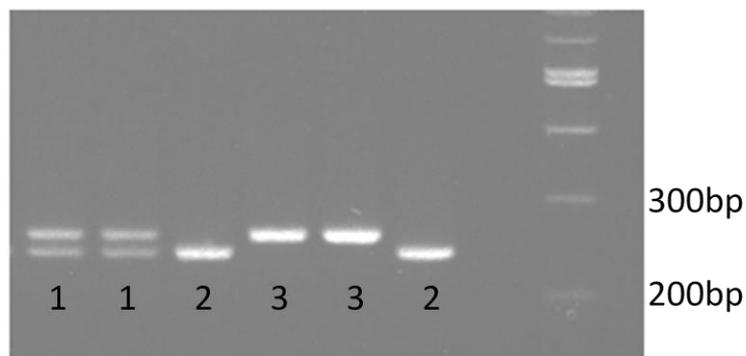
---

1. **Denaturierung:** 94°C für 3 min und 30 sec. Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen.
2. **Primerhybridisierung:** 57°C für 1 min. Anlagerung der Primer an die gerade entstandenen Einzelstränge.
3. **Elongation:** 72°C für 1 min. Vervielfältigung der Einzelstränge durch die Taq-Polymerase  
Dieser Zyklus wurde 36x wiederholt, wodurch die Menge an neu synthetisierter DNA exponentiell zunahm
4. **Stoppen** der Reaktion: 4°C

Nach Ablauf dieser Schritte wurden die Proben mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.2.1.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dazu, die in der PCR vervielfältigten DNA-Stränge unter Einfluss eines elektrischen Feldes aufzutrennen. Dazu wurde ein 2% Agarosegel hergestellt, indem in 150 ml 1x-TAE-Puffer 3 g Agarose unter mehrmaligem Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde. Vor dem Befüllen der Flachbettgelapparaturen mit der noch flüssigen Agarose wurde dem Gemisch 7,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Zur Aussparung der Geltaschen wurden Teflonkämme verwendet. Das erkaltete Gel wurde in eine mit 1x-TAE-Puffer gefüllte Laufwanne gelegt und je 20 µl der PCR-Proben in die Geltaschen pipettiert. Um die Größe der Produkte bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Größenmarker (100 bp DNA ladder) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 45 min bei 120 Volt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem Gel-Dokumentationsgerät durch UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht. Bei DTA-homozygoten Tieren entsteht ein 242 bp großes Produkt und bei Wildtyp-Tieren ein ca. 280 bp großes Produkt. Bei heterozygoten Tieren entstehen beide Produkte (Abb. 2.1). Für die vorliegende Arbeit wurden nur die heterozygoten Tiere verwendet.



**Abb. 2.1:** Agarose-Gel (2%) einer DTA PCR nach ca. 45 min Elektrophorese bei 120 Volt. Das Gel ist mit Ethidiumbromid versetzt und die Banden sind durch Anregung mit UV-Licht (260nm) sichtbar gemacht. (1) Doppelbande 242 bp+280 bp = heterozygot, (2) Bande in der Größe von 242 bp = homozygot, (3) Bande in der Größe von 280 bp = wildtyp. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wird eine 100 bp DNA-ladder (New England Biolabs) verwendet.

## 2.2.2 INDUKTION DER TRANSGENEXPRESSION

Wie bereits unter Punkt 1.2.5 beschrieben, handelte es sich bei den Versuchstieren um vierfach transgene Mäuse, die induzierbar DTA176 in den parietalen Epithelzellen des *Glomerulum* exprimieren. Für die Induktion der Expression bekamen die Tiere maximal 14 Tage lang 2 mg/ml Doxyzyklin über das Trinkwasser verabreicht (Trinkwasser = 50% Ringerlösung und 50% H<sub>2</sub>O). So wurde auch die Expression des LacZ und des e-GFP in den jeweils dafür transgenen Tieren induziert. Um den bitteren Geschmack des Doxyzyklins zu neutralisieren, wurde dem Wasser zusätzlich 5% Saccharose zugesetzt. Das lichtempfindliche Doxyzyklin wurde durch Einwickeln der Flaschen mit Aluminiumfolie geschützt und das Trinkwasser alle 2 Tage erneuert.

### 2.2.2.1 HERSTELLUNG UND INJEKTION DES THY 1.1-ANTIKÖRPERS

Der monoklonale Maus-Anti-Maus Thy 1.1 Antikörper (19XE5, Unterklasse IgG 3) wurde von der Nematologie-Abteilung der Agriculture University Wageningen, Niederlande, hergestellt (Lostrom et al. 1979). Für die Injektion wurden 1000 µg des affinitätsgereinigten, monoklonalen Antikörpers in 0,9% NaCl (Gesamtvolumen 200 µl) in die Schwanzvene injiziert (s. Abschnitt 1.2.5) (Assmann et al. 2002; Kollias et al. 1987).

## 2.2.3 URINGEWINNUNG UND -ANALYSE

### 2.2.3.1 METABOLISMUS-KÄFIGE

Um ausreichend Urin für die Analysen sammeln zu können, wurden die Tiere einzeln über Nacht (17 -18 h) in sog. Metabolismus-Käfige gesetzt. Hier wurden Urin und Kot getrennt voneinander gesammelt. Dabei erhielten die Mäuse kein Futter, wurden aber mit ausreichend Wasser versorgt. Da die Urinsammlung in den Räumen des Instituts für Versuchstierkunde des Uniklinikums der RWTH Aachen durchgeführt wurde, verblieben die Tiere in ihrem gewohnten Tag-und Nachtzyklus von jeweils 12 Std. Sowohl die Raumtemperatur als auch die Luftfeuchtigkeit waren ebenfalls unverändert (s. Abschnitt 2.1.1).



**Abb. 2.2: Beispielbild eines Metabolismus-Käfigs für Mäuse** (Firma Tecniplast)

### 2.2.3.2 MESSUNG DER TRINKWASSERMENGE

Die Mäuse wurden unter den Standardbedingungen der Räume der Versuchstierkunde des Uniklinikums der RWTH-Aachen gehalten (s. Abschnitt 2.1.1). Jedes Tier wurde für die Zeit der Messung der Trinkwassermenge einzeln in einen der standardisierten Kunststoffkäfige gesetzt. Den Mäusen wurde täglich 100 ml der Trinkflüssigkeit, bestehend aus 50 ml Ringerlösung, 50 ml Wasser, 2 mg/ml Doxzyklin und 5% Saccharose in der zum Käfig gehörenden Trinkflasche zur Verfügung gestellt. Diese Lösung wurde über 14 Tage alle 24 Std erneuert und die Differenz mit Hilfe eines 100 ml Messzylinders bestimmt (nach Ablauf der 14 tägigen Doxzyklinbehandlung wurde die Messung mit H<sub>2</sub>O weitergeführt).

### 2.2.3.3 ALBUMIN-BESTIMMUNG

Albumin ist ein 65-70 kDa großes negativ geladenes Markerprotein, welches bei intakter Nierenfunktion den glomerulären Filter zu 99,97% nicht passiert. Somit ist die Ausscheidung von Albumin im Urin ein Zeichen für eine funktionsgestörte Filtrationsbarriere.

### 2.2.3.3.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Bei einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS (engl.: „sodium dodecyl sulphate“) ist ein anionisches Tensid und sorgt dafür, dass die Proteine gleichmäßig negativ geladen sind, indem es deren Eigenladung überdeckt. So ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine allein von ihrer Größe abhängig (Laemmli 1970; Schägger et al. 1988).

Um nun die in den Metabolismus-Käfigen gewonnenen Urinproben auf ihren Albumingehalt zu untersuchen, wurden die Proben zunächst bei ca. 3000 G und 4°C zentrifugiert, um eventuelle Schwebstoffe zu sedimentieren. Danach wurden 50 µl jeder Urinprobe mit 25 µl 5x-Puffer (nach Laemmli) und 2,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Letztendlich wurden die Proben erneut zentrifugiert, um das beim Kochen entstandene Kondenswasser nicht zu verlieren, und danach auf Eis gekühlt.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde ein NuPage-Novex-Elektrophorese-System von Invitrogen verwendet. Die genutzten Bis-Tris-Gele hatten einen Konzentrationsgradienten von 4-12%. Auf diese Gele wurden jeweils 20 µl der aufbereiteten Proben aufgetragen. Als Standards dienten definiert konzentrierte BSA-Proben, die auf die gleiche Weise aufbereitet wurden wie die Urinproben. Auch davon wurden jeweils 20 µl aufgetragen. Als Laufpuffer wurde der MOPS-SDS-running-buffer genutzt (25 ml 20x MOPS auf 475 ml ddH<sub>2</sub>O). Die Elektrophorese lief bei 160 V für ca. eine Stunde.

Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Coomassie-Brilliant-Blau (meist nur Coomassie genannt) ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Proteine anlagert und diese so unspezifisch markiert. Dazu wurde das Gel für ca. 1 Std in SimplyBlue-SafeStain gelegt. Danach wurde es in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in Entfärbelösung (20% Methanol, 10% Eisessig, 70% ddH<sub>2</sub>O) entfärbt.

Diese Methode diente zunächst dem qualitativen Nachweis einer Albuminurie der Versuchstiere und im Weiteren zur Ermittlung von Schätzwerten, was die Albuminmenge betrifft. Dies ließ sich anhand der Stärke der Banden auf der Höhe von

Albumin (65-70 kDa) und im Vergleich zum ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennten BSA-Standard abschätzen. Nachfolgend wurde zur genauen Quantifizierung ein spezieller, sehr sensitiver Albumin-ELISA (2.2.3.2.2) durchgeführt.

Freundlicherweise haben Prof. Heidenreich und sein Team des Diagnostik-Labors Interneph in Aachen die Urinproben weitergehend untersucht. Es wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Kombination mit einer Silberfärbung durchgeführt. Diese Methode ist etwa 100-fach sensitiver als die Coomassie-Färbung. Zusätzlich wurde der Urin densitometrisch untersucht. So ließ sich erkennen welchen Ursprungs die Proteinurie gewesen sein könnte (Beckers et al. 2008).

#### 2.2.3.3.2 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Zur genauen Bestimmung der Albuminmenge in den gesammelten Urinproben wurde ein „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) durchgeführt (Engvall and Perlmann 1971). Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, an ein bestimmtes Antigen (den nachzuweisenden Stoff, hier Albumin) zu binden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dafür ein kommerziell erhältlicher Sandwich-ELISA („Mouse Albumin ELISA Quantitation Set“, Bethyl Laboratories) verwendet. Dieser ELISA wurde speziell zur Detektion von Albuminen in Blut und Urin von Mäusen entwickelt und erwies sich bei einem Erkennungsbereich von 7,8-500 ng/ml als sehr sensitiv.

Bei der Durchführung wurde strikt nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

Zunächst wurde eine 96 Well Mikrotiterplatte mit 100 µl des gelösten Erstantikörpers (1 µl Antikörper/100 µl „coating buffer“) pro Well beschichtet (coating). Nach einer Inkubationszeit von 1 Std bei Raumtemperatur wurde die Platte 5x gewaschen und dann für 30 min mit 200 µl Blockierlösung pro Well behandelt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Danach wurde die Platte erneut 5x gewaschen. Während der Inkubationszeiten konnte die Standardreihe hergestellt werden. Dazu wurde das mitgelieferte „mouse reference serum“ (RS10-101-5 45 mg/ml Albumin) nach folgendem Schema verdünnt:

Standard	Albuminkonzentration in ng/ml	Volumen, das in die Verdünnungslösung pipettiert wird	Volumen Verdünnungs- Lösung
Initial	10000	4 µl des Standard- Serums (RS10-101-5, 45mg/ml Albumin)	18 ml
1	500	500 µl der Initiallösung	9.5 ml
2	250	500 µl von Standard 1	500 µl
3	125	500 µl von Standard 2	500 µl
4	62.5	500 µl von Standard 3	500 µl
5	31.25	500 µl von Standard 4	500 µl
6	15.625	500 µl von Standard 5	500 µl
7	7.8	500 µl von Standard 6	500 µl
8	0	nichts	500 µl

**Tab. 2.23: Schema zur Herstellung der Standardreihe für den Albumin ELISA.**

Außerdem wurden die Urinproben so mit der gleichen Verdünnungslösung versetzt, dass die Albuminkonzentration im Bereich der Standardreihe lag (in diesem Fall 1:5000).

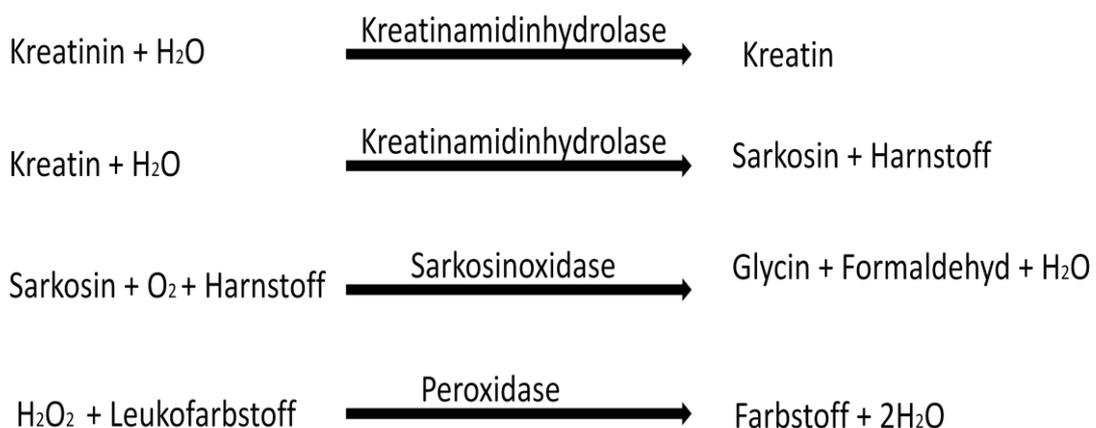
Nach Abschluss des „blockings“ wurde nun pro Well 100 µl eines Standards bzw. einer adäquat verdünnten Probe aufgetragen, wobei jede Probe im Doppelansatz bestimmt wurde. Wieder wurde für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte der Erstantikörper an das Zielprotein (Albumin) in den Standards sowie den zu testenden Urinproben binden. Zum Entfernen der ungebundenen Bestandteile der Probe wurde die Platte erneut 5x gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Zweitantikörpers (auch Detektionsantikörper) in einer Verdünnung von 1:35.000 in jedes Well pipettiert. Bei dem Zweitantikörper handelte es sich um einen HRP-gekoppelten Antikörper (engl. „horseradish peroxidase“, deutsch: Meerrettichperoxidase), der an ein anderes Epitop des Antigens bindet als der Erstantikörper. So entstand der für den Sandwich-ELISA namensgebende Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex. Wieder wurde für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5x gewaschen, und danach 100 µl TMB-Substratlösung (Tetramethylbenzidin) in jedes Well pipettiert. Dieses Substrat wird von der

Meerrettichperoxidase, die an den Zweitantikörper gekoppelt ist, umgesetzt, so dass es zu einem Farbumschlag kommt. Dazu wurde die Platte für 15 min lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Well gestoppt. Die Stärke des Farbumschlags erfolgte dabei proportional zur Proteinkonzentration und die Lichtabsorption konnte in einem Plattenleser bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen werden. Durch Vergleich mit der Standardreihe konnte letztlich die Albuminkonzentration pro Probe berechnet werden.

#### 2.2.3.4 KREATININ-BESTIMMUNG

Kreatinin ist ein harnpflichtiges Endprodukt des Energiestoffwechsels der quergestreiften Muskulatur. Es wird abhängig von Alter und Trainingszustand des Tieres/Menschen sowie der Muskelmasse relativ konstant zumeist glomerulär filtriert und kann somit zur Normalisierung der Albuminwerte genutzt werden.

Die quantitative Kreatinin-Bestimmung wurde im Labor für molekulare Diagnostik am Institut für Versuchstierkunde des Universitätsklinikums Aachen durchgeführt. Dort wurde der Mäuseurin mit der VITROS CREA-Methode mit Analyseplättchen untersucht. Diese Methode wurde unter Verwendung von VITROS CREA-Plättchen und VITROS Chemistry Products Calibrator Kit 1 mit dem VITROS Chemistry System vorgenommen.



**Abb. 2.3: Reaktionsprinzip der VITROS CREA-Methode**

Mit Hilfe der so ermittelten Kreatininwerte konnte die Albumin/Kreatinin-Ratio berechnet werden.

## 2.2.4 ENTNAHME DER NIEREN

Für die Entnahme der Nieren mit nachfolgender immunhistochemischer Analyse wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Anschließend wurden die Füße auf der Operationsunterlage fixiert, Abdomen und Brustkorb eröffnet, sowie das Herz freigelegt. Um das Blut auszuwaschen und die Gewebe zu fixieren, wurde der rechte Vorhof eröffnet und eine Kanüle (22 G) in die Spitze der linken Kammer geschoben. Mit möglichst konstantem Druck wurden nun ca. 50 ml einer 3% Paraformaldehydlösung injiziert. Dabei starben die Tiere schmerzfrei.

Nun wurden beide Nieren entnommen, entkapselt und von jeder Niere wurde je ein Drittel in Einbettkassetten mit Formalin nachfixiert. Mit diesen Gewebeproben wurden später die PAS-Reaktion, die Immunhistochemie und auch die Immunfluoreszenz durchgeführt. Ein weiteres Drittel wurde in Tissue-Tek eingebettet und vorsichtig in Stickstoff tiefgefroren, da nur mit kryokonserviertem Gewebe die X-Gal Färbung funktioniert. Das letzte Drittel (in diesem Fall immer ein Polstück) wurde in sehr kleine Stücke geschnitten und für die Elektronenmikroskopie mit  $\frac{1}{2}$ -Karnovsky-Medium fixiert.

## 2.2.5 HISTOLOGISCHE AUFBEREITUNG FÜR DIE MIKROSKOPIE

### 2.2.5.1 HERSTELLUNG VON PARAFFINBLÖCKEN

Im Einbettautomaten erfolgte die Überführung des Formalin-fixierten Gewebes in Paraffin. Zunächst wurden die Gewebe zum Entwässern einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen (je 90 min in 1x 50% Alkohol, 2x 70%, 2x 80%, 1x 96%, 2x 100%). Danach wurde das Intermedium Xylol (je 2x90 min) verwendet. Schließlich wurden die Proben in 60°C heißes Paraffin eingebettet, die Paraffin-durchtränkten Gewebe in die Ausgießstation überführt und dort manuell in Ausgussformen aus Edelstahl gelegt. Durch Erkaltung des Paraffins mittels Kühlplatte wurden so schließlich Paraffinblöcke hergestellt.

Nach Säuberung der Blöckchen waren diese bereit für die Bearbeitung im Rotationsmikrotom.

#### 2.2.5.2 SCHNEIDEN DER PARAFFINBLÖCKE

Für die PAS-Reaktion und die verschiedenen Immunomethoden wurden Paraffinschnitte der Nierengewebe eingesetzt. Das Rotationsmikrotom (Leica RM2145) war auf eine Schnittdicke von 1  $\mu\text{m}$  eingestellt. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte auf ein Paraffin-Streckbad (37°C) gelegt und dann auf SuperFrostPlus-Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden von Frau Astrid Fuss hergestellt.

#### 2.2.5.3 SCHNEIDEN DER KRYOBLÖCKE

Die in Tissue-Tek eingefrorenen renalen Gewebeproben wurden in einem Gefriermikrotom (Leica CM3050S) bei -21°C auf eine Dicke von 5  $\mu\text{m}$  geschnitten. Der Nierenschnitt wurde jeweils direkt mit einem raumtemperierten SuperFrost-Objektträger aufgenommen, 5 min in Post-Fix (8 ml Glutaraldehyd, 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{l}$  SDS 10%, 20  $\mu\text{l}$  NP40 auf 100 ml mit 1xPBS auffüllen) nachfixiert und danach sofort in die X-Gal Lösung gegeben (s. Abschnitt 2.2.5.4.5). Die Kryoschnitte wurden von Frau Peggy Jirak angefertigt.

#### 2.2.5.4 FÄRBUNGEN

##### 2.2.5.4.1 PAS-REAKTION

Die „periodic acid Schiffs reaction“ beruht darauf, dass die Perjodsäure bestimmte, vor allem in Polysacchariden vorkommende Glycol-haltige Gruppen aufspaltet und zu Aldehyden oxidiert. Diese werden dann durch Bindung des „Schiffs-Reagenz“ (= fuchsin-schwefelige Säure) magenta-rot gefärbt. So werden Myko- und Glykoproteine, Polysaccharide, neutrale Polysaccharide, Glykolipide und Phospholipide angefärbt und Strukturen wie Basalmembranen, Zellwände und Kollagene sichtbar gemacht. Die

Zellkerne werden durch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, das sich an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren anlagert, sichtbar gemacht.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Xylol für 3x 5 min entparaffiniert. Danach wurden diese durch die absteigende Alkoholreihe (je 3x2 min 100% Ethanol, 2x2 min 96%, 1x2 min 70%) und 5 min Spülung in Aqua dest. rehydriert. Mit 2% Perjodsäure wurden die Schnitte nun für 30 min behandelt, danach 3x 2 min in Aqua dest. gewaschen, für 60 min im Dunkeln im Schiffs-Reagenz inkubiert und final für 5 min unter fließendem Wasser gespült. Anschließend wurde die Kernfärbung durchgeführt, indem die Schnitte für 10 min in Hämatoxylinlösung getaucht wurden und danach für 10 min unter warmem, fließendem Leitungswasser gebläut wurden.

Zum Schluss wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe (1x2 min 70% Ethanol, 2x2 min 96% und 3x2 min 100%) entwässert und anschließend das Ethanol durch 3x Inkubation für jeweils 5 min in Xylol entfernt. Schließlich konnten die Schnitte mit Histokitt gedeckelt und staubgeschützt aufbewahrt werden.

#### 2.2.5.4.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Bei der Immunhistochemie werden Antigene z.B. Proteine, direkt in Gewebeschnitten mittels spezifischer Antikörper detektiert. Dabei kann nicht nur das Vorhandensein verschiedener Antigene, sondern auch deren Lokalisation im Gewebe nachgewiesen werden.

Das Funktionsprinzip ist die Bindung des Erstantikörpers an das gesuchte Antigen und die Kopplung eines biotinylierten bzw. Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörpers an diesen Erstantikörper. Im Falle der Biotinylierung wird der Zweitantikörper durch Zugabe eines mit einem Enzym gekoppelten Avidin-Biotin-Komplexes, der an das Biotin dieses Zweitantikörpers bindet, markiert. Da ein Zweitantikörper mehrere biotinylierte Stellen besitzt und die Avidin-Biotin-Komplexe sich untereinander zusätzlich vernetzen, findet letztlich eine mehrfache Signalverstärkung beim Nachweis eines gewebespezifischen Antigens (= Proteins) statt (Ramos-Vara 2005). Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzym handelt es sich um die unter Punkt 2.2.3.2.2 bereits erwähnte Meerrettichperoxidase (HRP). Diese Peroxidase ist in der Lage, in Gegenwart von  $H_2O_2$  als Cosubstrat das zuvor farblose Diaminobenzidin (DAB) zu

oxidieren, so dass ein farbiges (braunes) Endprodukt entsteht und letztlich die Bindung des Erstantikörpers sichtbar gemacht wird (Abb. 2.4) (Adams 1992; Ramos-Vara 2005).

Die Paraffinschnitte wurden zunächst, wie bereits unter Punkt 2.2.5.4.1 beschrieben, entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe gewässert. Danach wurden die Schnitte 3x für 5 min in 198 ml ddH<sub>2</sub>O plus 2 ml Demaskierungspuffer („antigen unmasking solution“) zur Epitopfreilegung in der Mikrowelle (500 Watt) erhitzt. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren (ca. 20 min), wurden sie in 1x-PBS gewaschen, danach inkubierten die Gewebe für 10 min in 3% Wasserstoffperoxidlösung, um endogene Peroxidasen zu blockieren und so falsch positiven Signalen vorzubeugen. Außerdem wurde endogenes Biotin durch jeweils 10 min Inkubation mit Avidin- bzw. Biotin- „blocking solution“ blockiert. Nach erneutem Waschen in 1x-PBS wurde dann der Erstantikörper in entsprechender Verdünnung (s. Abschnitt 2.1.6.1) in 1% BSA/PBS mit einem Volumen von 40 µl auf jeden Schnitt gegeben und diese für 1 Std in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde ungebundener Erstantikörper durch 2x 5 min Waschen in 1x-PBS vom Gewebe entfernt. Nachfolgend wurden ebenfalls 40 µl des biotinylierten Zweitantikörpers, gelöst in 1% BSA/PBS (Verdünnung s. Abschnitt 2.1.6.2) auf die Schnitte pipettiert und diese für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde wieder 2x 5 min in 1x-PBS gewaschen. Schließlich wurden 50 µl des stets 30 min vor Nutzung frisch angesetzten AB-Komplexes (15 µl Reagenz A + 15 µl Reagenz B in 1000 µl 1% BSA/PBS) auf die Gewebe pipettiert und 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach nochmaligem Waschen (2x5 min in 1x-PBS) wurde die Enzymreaktion mit dem DAB-Vector-Kit initiiert. Dazu wurden je 50 µl einer ebenfalls stets frisch angesetzten Mischung aus 5 ml ddH<sub>2</sub>O + 2 Tropfen Puffer + 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4 Tropfen DAB + 2 Tropfen Nickelchlorid auf die Schnitte pipettiert. Nach genau 10 min wurde die Reaktion durch 2x 2 min Waschen der Schnitte in ddH<sub>2</sub>O gestoppt. Durch anschließendes 2-minütiges Dippen in Methylgrün (oder Hämatoxylin) wurden die Zellkerne durch spezifische Bindung des Farbstoffs an die AT-Basenpaare der DNA markiert. Zum Schluss wurden die Schnitte wie unter Punkt 2.2.5.4.1 beschrieben durch die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Histokitt eingedeckelt.

Für die Färbung gegen BrdU wurden die Schnitte vor der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 2N HCl für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie in Borat-Puffer für 10 min

neutralisiert und dem vorher beschriebenen Standardprotokoll für die Immunhistochemie unterzogen.

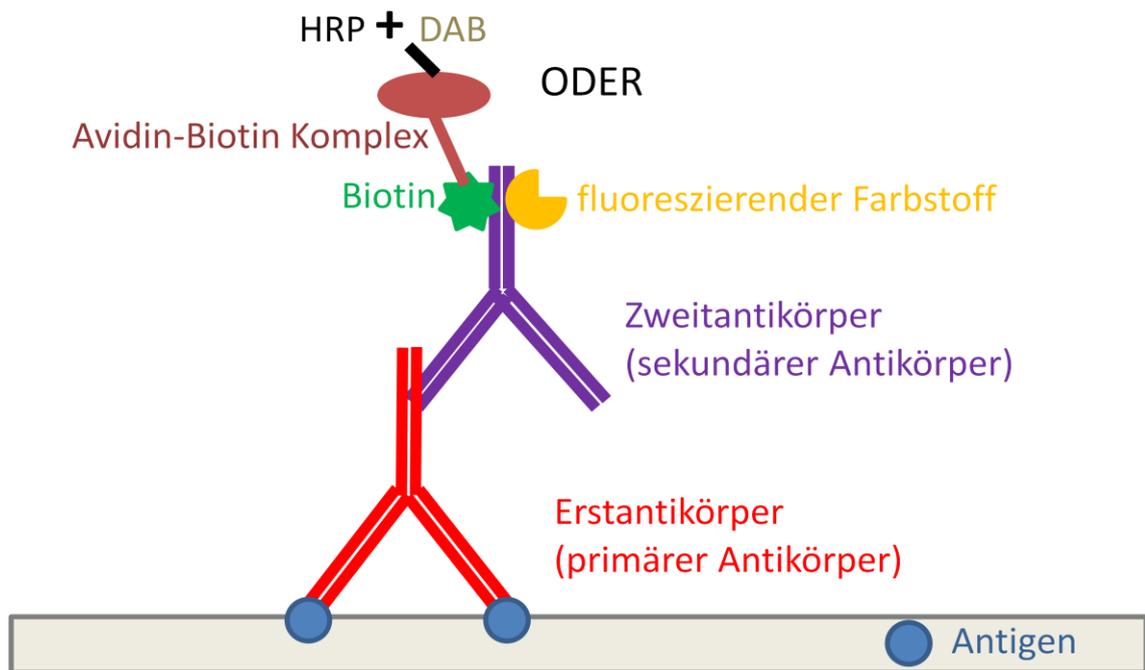
Bei der Kombination der Immunhistochemie mit der PAS-Reaktion wurde zunächst die Immunhistochemie wie oben beschrieben durchgeführt. Nach Abschluss der Inkubation mit DAB und dem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wurde das Protokoll für die PAS-Reaktion beginnend mit dem Perjodsäureschritt fortgesetzt.

#### 2.2.5.4.3 IMMUNFLUORESCENZ

Bei der Immunfluoreszenz verwendet man, genau wie bei der Immunhistochemie, einen Erstantikörper, der spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. An diesen ersten Antikörper bindet dann ein Zweitantikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist (Abb.: 2.4). Dieser lässt sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz anregen, so dass die zelluläre Lokalisation des Antigens im Gewebe sichtbar wird (Coons and Kaplan 1950).

Da die in dieser Arbeit gezeigten Immunfluoreszenzen auch an Paraffinschnitten durchgeführt wurden, war die Vorbereitung der Schnitte zunächst die gleiche wie die für die Immunhistochemie. Das heißt: Entparaffinieren, absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung und 3x 5 min erhitzen in der Mikrowelle in Demaskierungspuffer bei 500 Watt. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie in 1x-PBS gewaschen. Nun folgte direkt die einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper in einer feuchten Kammer. Dieser wurde in 1x-PBS entsprechend verdünnt und mit einem Volumen von 40 µl auf jeden Schnitt pipettiert. Danach wurden die Schnitte 2x 5 min gewaschen und anschließend mit 40 µl des ebenfalls in 1x-PBS verdünnten Zweitantikörpers benetzt. So inkubierten die Gewebeschnitte für 30 min in der dunklen, feuchten Kammer. Da der Zweitantikörper fluoreszenzmarkiert und somit lichtempfindlich war, wurden alle folgenden Arbeiten möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Schnitte wurden erneut in PBS gewaschen. Zum Schluss wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 durchgeführt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA und fluoresziert bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 350 nm blau. Dazu wurde Hoechst 33342 (10 mg/ml) 1:10.000 mit PBS verdünnt und die Schnitte in einer Küvette für eine Inkubationszeit von 15 min damit umspült.

Schließlich wurden die Schnitte mit Immu-Mount wässrig eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.



**Abb. 2.4: Funktionsprinzip von Immunfärbungen.** Der **Erstantikörper** bindet an das gesuchte **Antigen** im Gewebe. Der **Zweitantikörper** bindet speziesspezifisch an den **Erstantikörper** und ist im Falle der **Immunhistochemie** biotinyliert. Ein Enzym gekoppelter **Avidin-Biotin Komplex** (in diesem Fall HRP = Meerrettichperoxidase gekoppelt) bindet an das **Biotin** des **Zweitantikörpers**. Dieses Enzym ist in der Lage **DAB** (=Diaminobenzidin) zu oxidieren, so dass ein braunes Endprodukt entsteht und so die Lokalisation des **Antigens** im Gewebe markiert. Im Falle der **Immunfluoreszenz** ist der **Zweitantikörper** an einen **fluoreszierenden Farbstoff** gekoppelt, der durch Anregung mit Licht in einer bestimmten Wellenlänge die Lokalisation des **Antigens** sichtbar macht.

#### 2.2.5.4.4 TUNEL-ASSAY (APOP TAG PLUS FLUORESCIN IN SITU APOPTOSIS DETECTION KIT)

Apoptose repräsentiert eine Form des programmierten Zelltods, der von der betroffenen Zelle selbst ausgeführt wird (im Gegensatz zur Nekrose). Er kann von außen angeregt werden (durch Immunzellen) oder aufgrund zellinterner Prozesse ausgelöst werden (z.B. defekte Erbinformation). Die DNA wird dabei durch Endonukleasen in definierte Stücke fragmentiert. An den Bruchenden werden somit Hydroxylgruppen (3'-OH-Gruppen) frei, die im hier verwendeten Assay durch TdT

(terminal desoxynucleotidyl transferase) mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Nukleotide markiert und damit im Gewebeschnitt sichtbar gemacht werden (Gavrieli et al. 1992).

Auch hier wurde mit Paraffinschnitten gearbeitet. Deshalb wurde zunächst wieder mit Xylol entparaffiniert und die Gewebe in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Danach wurden die Schnitte zur Demaskierung der Antigene für 15 min mit Proteinase K behandelt (20 µg/ml) und überschüssiges Enzym nachfolgend durch zweimaliges Waschen in 1x-PBS wieder entfernt. Dann wurde für 10 sec der Äquilibriumspuffer auf die Schnitte pipettiert. Ohne anschließendes Waschen inkubierten die Nierenschnitte dann in der TdT-Arbeitslösung (70% reaction buffer+ 30% TdT-Enzym) für 1 Std bei 37°C. Die so behandelten Schnitte wurden für 15 min in der zum Kit gehörenden Stopplösung geschwenkt, um die vorhergehende Enzymreaktion zu beenden, und anschließend 3x in 1x-PBS gewaschen. Möglichst vor Licht geschützt, wurde nun das Anti-Digoxigenin-Konjugat (68 µl Blocking Lösung + 62 µl Anti Digoxigenin) für 30 min auf die Schnitte pipettiert. Zum Schluss wurde ein letztes Mal in 1x-PBS gewaschen und, wie oben beschrieben, mit Hoechst 33342 gegengefärbt und mit Immu-Mount wässrig eingedeckelt.

#### 2.2.5.4.5 X-GAL-FÄRBUNG

X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid) ist ein künstlich erzeugtes Glykosid. Das Enzym β-Galaktosidase hydrolysiert dieses Glykosid zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indoyl, welches nachfolgend durch den Sauerstoff der Luft zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird (Singh and Knox 1984). Da die hier verwendeten Mäuse die β-Galaktosidase induzierbar parietalzellspezifisch exprimierten, (s. Kapitel 1.2.5) ließen sich durch diese Färbung die Parietalzellen histochemisch nachweisen.

Für die X-Gal-Färbung wurden ausschließlich Kryostatschnitte verwendet. Diese wurden, wie bereits unter Punkt 2.2.5.3 beschrieben, direkt nach dem Schneiden für 5 min in Post-Fix fixiert und danach in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte in 500 µl X-Gal-Lösung (Zusammensetzung s. Tabelle 2.23) gegeben und über Nacht bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert, wobei die X-Gal-Lösung stets frisch angesetzt wurde. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS gewaschen und ca. 10 s mit Eosin

gegengefärbt. Zum Schluss wurden sie mit Immu-Mount eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Komponente	Konzentration Stock	Gebrauchskonzentration	Volumen
X-Gal	25 mg/ml	1 mg/ml	400 µl
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,5 M	5 mM	100 µl
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,5 M	5 mM	100 µl
MgCl <sub>2</sub>	1 M	2 mM	20 µl
SDS 10%		0,01%	10 µl
NP40		0,02%	2 µl
PBS			10 ml

**Tab. 2.24: Ansatz für 10 ml X-Gal Lösung**

#### 2.2.5.5 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine Methode, bei der das zu untersuchende Objekt mit Elektronenstrahlen „durchleuchtet“ wird. Die Auflösung eines TEMs ist gegenüber der Auflösung eines Lichtmikroskops deutlich höher. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie werden bei der TEM Elektronenstrahlen verwendet. Außerdem bestehen die Linsen nicht aus Glas, sondern aus elektromagnetischen Feldern. Allerdings gelten für diese Linsen die gleichen Brechungsgesetze, wie für die bei der Lichtmikroskopie verwendeten Glaslinsen. Die benötigten Elektronenstrahlen werden durch Anlegung einer Hochspannung zwischen einer Kathode und einer Anode erzeugt. Um Ablenkungen der Elektronen durch Luftmoleküle zu vermeiden, geschieht dies in einem Hochvakuum. Beim Auftreffen der Elektronenstrahlen auf die Probe werden diese gestreut und die Strahlen, die die Probe durchdringen, werden auf eine Bildebene projiziert. Damit dies möglich ist, müssen die Proben sehr dünn sein (10-100 nm).

Für die TEM wurden die Pole der perfundierten Nieren nach der Entnahme in sehr kleine Stücke geschnitten und in ½-Karnovskymedium fixiert.

Die weitere Verarbeitung der karnovskyfixierten Gewebe, d.h. Anfertigung von Semidünn- und Ultradünnschnitten, sowie die in dieser Arbeit gezeigten TEM-

Aufnahmen, wurden freundlicherweise von Prof. Wilhelm Kriz und seinem Team vom Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Universität Heidelberg vorgenommen. Das Erstellen der Aufnahmen von den Semidünnschnitten und die gesamte Auswertung wurden von mir durchgeführt.

### 2.2.6 GOLD-MARKIERTES BSA (BOVINES SERUM ALBUMIN)

Für dieses Experiment wurde den vierfach transgenen Mäusen 4 Tage und 9 Tage nach Induktion der Ablation, sowie nicht behandelten Kontrolltieren, je 700 µl Goldmarkiertes BSA intravenös injiziert. Dafür wurden die Tiere mit Ketamin und Rompun anästhesiert (s. Abschnitt 2.2.4). Etwa 15 min nach der Injektion des Albumins wurden die Tiere durch Genickbruch getötet, die Nieren entnommen und in Viertel geschnitten. Diese wurden dann für 48-72 h in 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gewebe für 30 min in PBS gewaschen, für 1 Std in 2,3 M Saccharoseselösung inkubiert, und letztendlich vorsichtig in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die Weiterverarbeitung der goldmarkierten Gewebe, d.h. die Anfertigung der Semidünn- und Dickschnitte, wurde freundlicherweise von Dr. Dijkman vom Institut für Pathologie der Radboud Universität Nijmegen durchgeführt. Die Aufnahmen und die Auswertungen wurden von mir gemacht.

### 2.2.7 STATISTIK

Beim Vergleich von Behandlungsgruppen mit gleichen n-Zahlen wurden die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes angegeben (SD). Bei Auswertungen, die unterschiedlich große Gruppen miteinander vergleichen, wurden die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die Daten wurden durch einen Student-t-Test (one-tailed, Zweistichproben unter der Annahme ungleicher Varianz) mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2007 oder Graph Pad Prism 5 analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

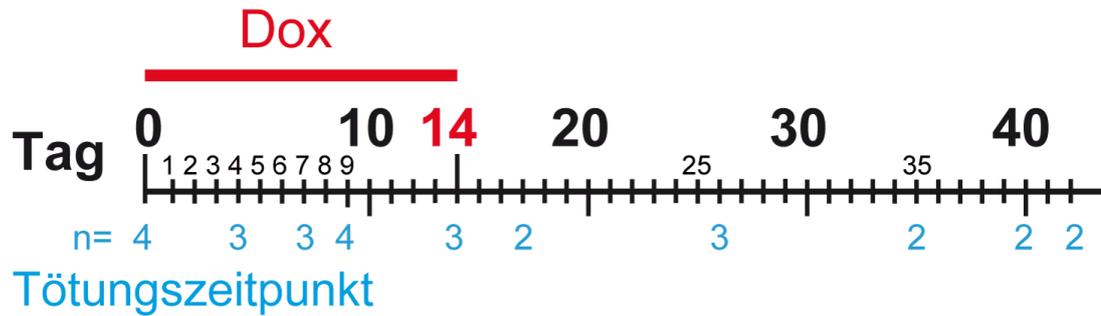
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 CHARAKTERISIERUNG DES NIEREN-PHÄNOTYPS IM PARIETALZELL-ABLATIONS-MODELL

Um in den unter Punkt 1.2.5 bereits beschriebenen, vierfach transgenen PEC-rtTA-/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Mäusen die PEC-Ablation durch Expression des Diphtherietoxins (DTA) und der  $\beta$ -Galaktosidase zu induzieren, bekamen die Mäuse 2 mg/ml Doxzyklin über das Trinkwasser für 14 Tage verabreicht. Das Trinkwasser bestand dabei zu 50% aus Ringer-Lösung, da der Promotor zwar hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, in Parietalzellen aktiv ist. So wurden die Tiere vor potenziellem Salzverlust durch mögliche Tubulusschäden geschützt.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ablation wurden die vierfach transgenen Mäuse getötet, die Nieren entnommen und histologisch aufbereitet (Abb. 3.1). Um die morphologischen Veränderungen in den Nieren der mit Doxzyklin behandelten, vierfach transgenen Tiere beurteilen zu können und auszuschließen, dass allein der Genotyp eine Nierenpathologie auslöste, wurden außerdem Mäuse mit demselben genetischen Hintergrund vor der Doxzyklinbehandlung getötet (Abb. 3.1 Kontrollgruppe 1 = Tag 0, n=4). Desweiteren sollte ausgeschlossen werden, dass durch die Doxzyklinbehandlung pathologische Veränderungen in den Nieren der Versuchstiere auftraten. Dazu wurden nicht DTA-transgene Wurfgeschwister ebenfalls 14 Tage lang mit 2 mg Doxzyklin pro ml Trinkwasser (50% Ringer-Lösung) behandelt (Kontrollgruppe 2, n=3).

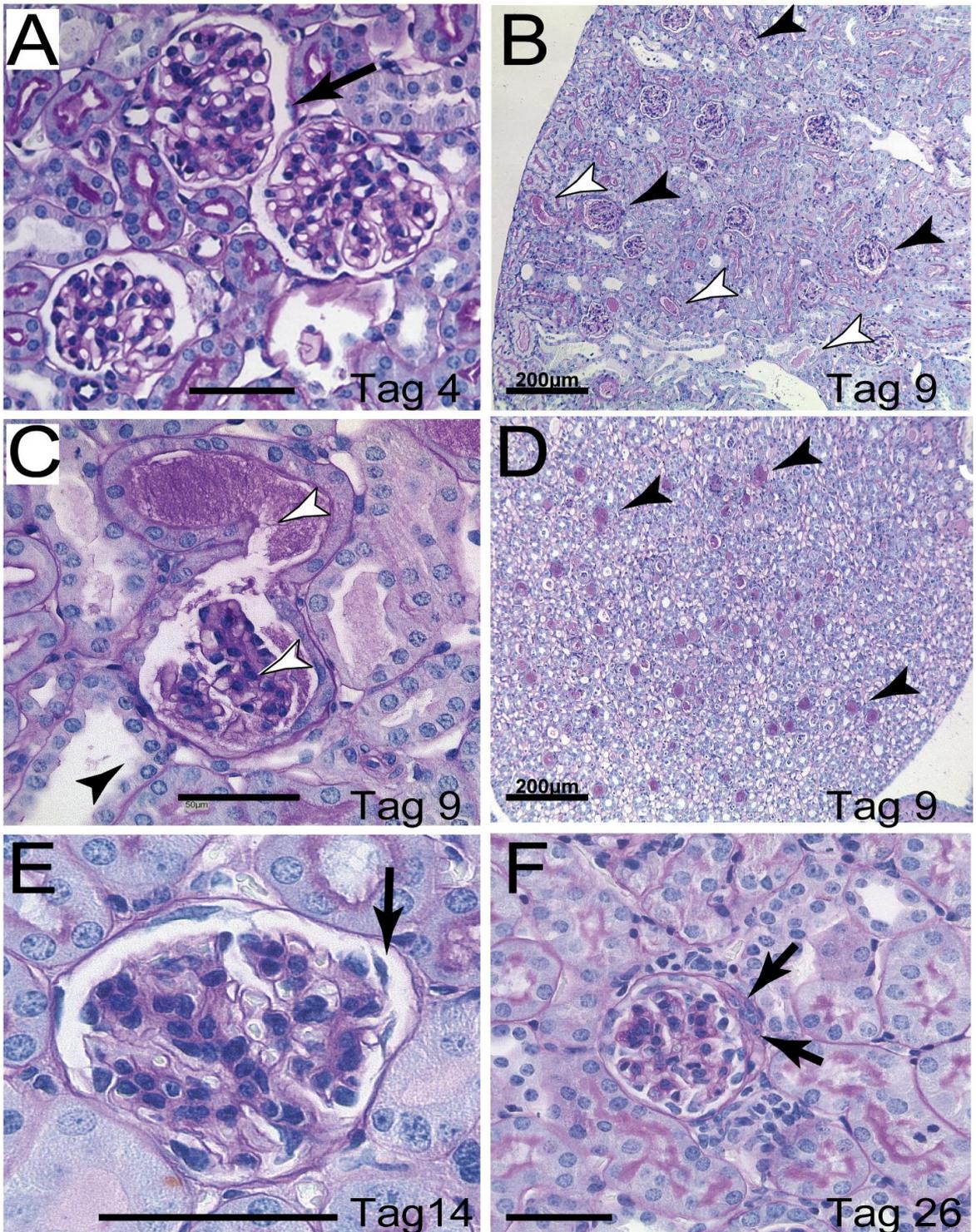
Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet, um ein geschlechtsspezifisches Auftreten der Veränderungen in den Versuchstieren auszuschließen. Da aber vermutet wird, dass sich die *Glomerula* von weiblichen und männlichen Mäusen, im Hinblick auf das Vorhandensein von proximalen Tubuluszellen auf der Bowman-Kapsel unterscheiden, wird in der vorliegenden Arbeit zu jeder Aufnahme einer Niere ein Vermerk zum Geschlecht der dazugehörigen Maus zu finden sein.

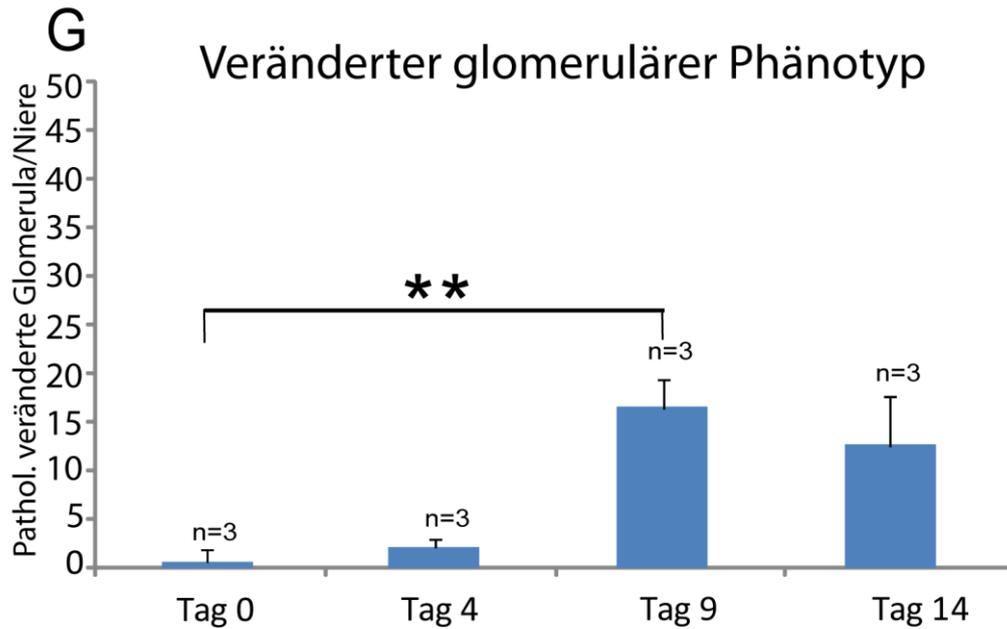


**Abb. 3.1: Zeitlicher Verlauf des Versuchs.** In den vierfach transgenen Mäusen wurde über 14 Tage die Ablation der Parietalzellen induziert. Das geschah durch die Gabe von 2mg Doxyzyklin(Dox) pro Milliliter Trinkwasser. Die Anzahl der getöteten Tiere pro Zeitpunkt (n) ist unter dem Zeitstrahl ablesbar. Tag 0 stellt die Kontrollgruppe 1 (4 fach transgene Tiere, die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden) dar. Kontrollgruppe 2 mit n=3 (nicht transgene Tiere nach 14 Tage 2mg/ml Doxyzyklin) ist nicht dargestellt. Insgesamt gilt n=31.

Das DTA wirkt über Translationshemmung durch Inaktivierung eines Elongationsfaktors. Da diese Inaktivierung ca. 3-4 Tage dauert, wurde Tag 4 nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung als erster Tötungszeitpunkt gewählt (Honjo et al. 1968; Mitamura et al. 1995). Wie in der PAS-Reaktion zu erkennen war, war die Morphologie der gesamten Niere an Tag 4, im Vergleich zur Niere eines unbehandelten Tieres, völlig unverändert. Das innere Blatt der Bowman-Kapsel zeigte sich bedeckt mit flachen Parietalzellen und auch die Tubuli stellten sich unverändert dar (Abb. 3.2 A). Die deutlichsten Veränderungen im Phänotyp waren an Tag 9 zu erkennen. In ungefähr 30% der *Glomerula* (Tag 0: 0,7 ( $\pm$  1,1) *Glomerula*/Niere; Tag 4: 2 ( $\pm$  1) *Glomerula*/Niere; Tag 9: 16 ( $\pm$  3) *Glomerula*/Niere) konnte Protein im Bowman'schen Raum (rosa) und im sich anschließenden proximalen Tubulus detektiert werden. Die Parietalzellen sahen geschwollen aus und waren nicht mehr deutlich abgrenzbar. Etwa 70% der *Glomerula* waren nicht von der PEC-Ablation betroffen, so dass von einem fokalen Geschehen gesprochen werden kann (Abb 3.2 G) Auch in der Nierenpapille zeigte sich ein Teil der Tubuli proteingefüllt, was den fokalen Charakter der pathologischen Veränderungen ebenfalls verdeutlicht (Abb. 3.2 D). An Tag 14 zeigten sich Parietalzellen, die nicht mehr mit ihrer Basalmembran verbunden waren. Auch diese Veränderungen waren in ca. 30% der *Glomerula* sichtbar (Tag 14: 12 ( $\pm$  5) *Glomerula*/Niere, Abb 3.2 G). Proteinzylinder waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu entdecken, weder im Bowman'schen Raum noch in den Tubuli (Abb. 3.2 E). Spätere Zeitpunkte (also nach

Tag 14, an dem die Doxzyklingabe gestoppt wurde) zeichneten sich besonders durch extrakapillare Proliferationen in den betroffenen *Glomerula* aus (Abb. 3.2 F).



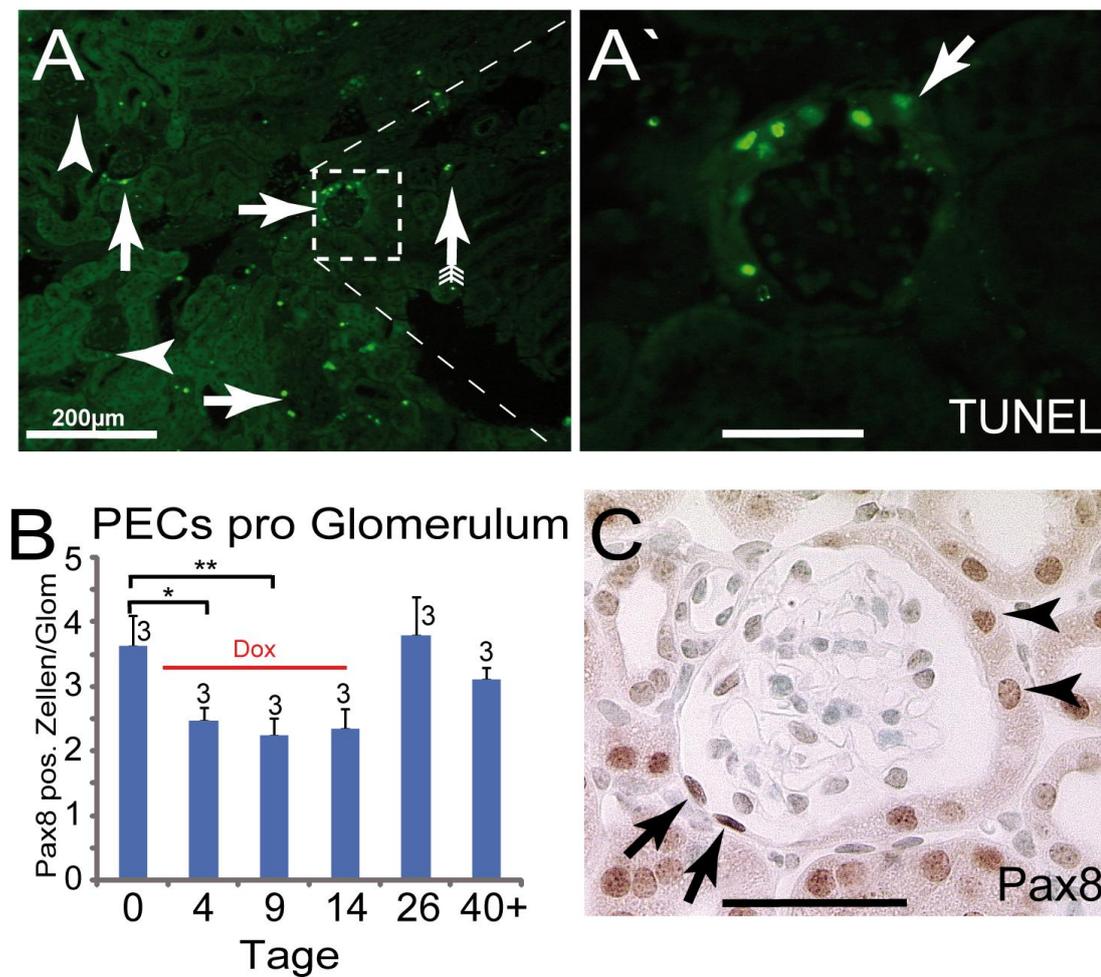


**Abb. 3.2: Veränderung des glomerulären Phänotyps während der PEC-Ablation (A-F)** PAS-Reaktion : Nierengewebe zu verschiedenen Zeitpunkten der Ablation. (A) An Tag 4 nach Beginn der Doxzyklinbehandlung sind weder in den Parietalzellen (Pfeil), noch anderswo in der Niere morphologische Veränderungen zu erkennen (weibliche Maus). An Tag 9 (B-D) lassen sich pathologische Veränderungen in den *Glomerula* (B, schwarze Pfeilspitzen) und mit Proteinzylindern gefüllte proximale Tubuli (weiße Pfeilspitzen) detektieren. (C) *Glomerulum* mit Protein im Bowman'schen Raum und im angrenzenden proximalen Tubulus (weiße Pfeilspitzen). Die Bowman-Kapsel ist mit flockigem, nicht begrenztem Material bedeckt (schwarze Pfeilspitze). (D) In der Papille zeigt sich ein Teil der Tubuli gefüllt mit Protein (Pfeilspitzen; bei den Mäusen B-D handelt es sich um männliche Tiere). (E) An Tag 14 lösen sich die Parietalzellen teilweise von der Bowman-Kapsel (Pfeil, weibliches Tier). (F) Die späten Zeitpunkte (hier Tag 26) sind charakterisiert durch extrakapillare Proliferationen (sog. zelluläre Halbmonde, englisch „crescents“, Pfeile; 10 Wochen alte weibliche Maus). (G) Quantitative Auswertung der pathologischen Veränderungen der *Glomerula*. An Tag 9 konnte gezeigt werden, dass ca. 30% der *Glomerula* einen veränderten Phänotyp aufwiesen. Es wurden 50 *Glomerula* pro Tier in 3 Tieren pro Zeitpunkt in je einem Gewebeschnitt ausgewertet. Der Balken stellt den Mittelwert  $\pm$  SD dar, \*\*  $p < 0,01$ .

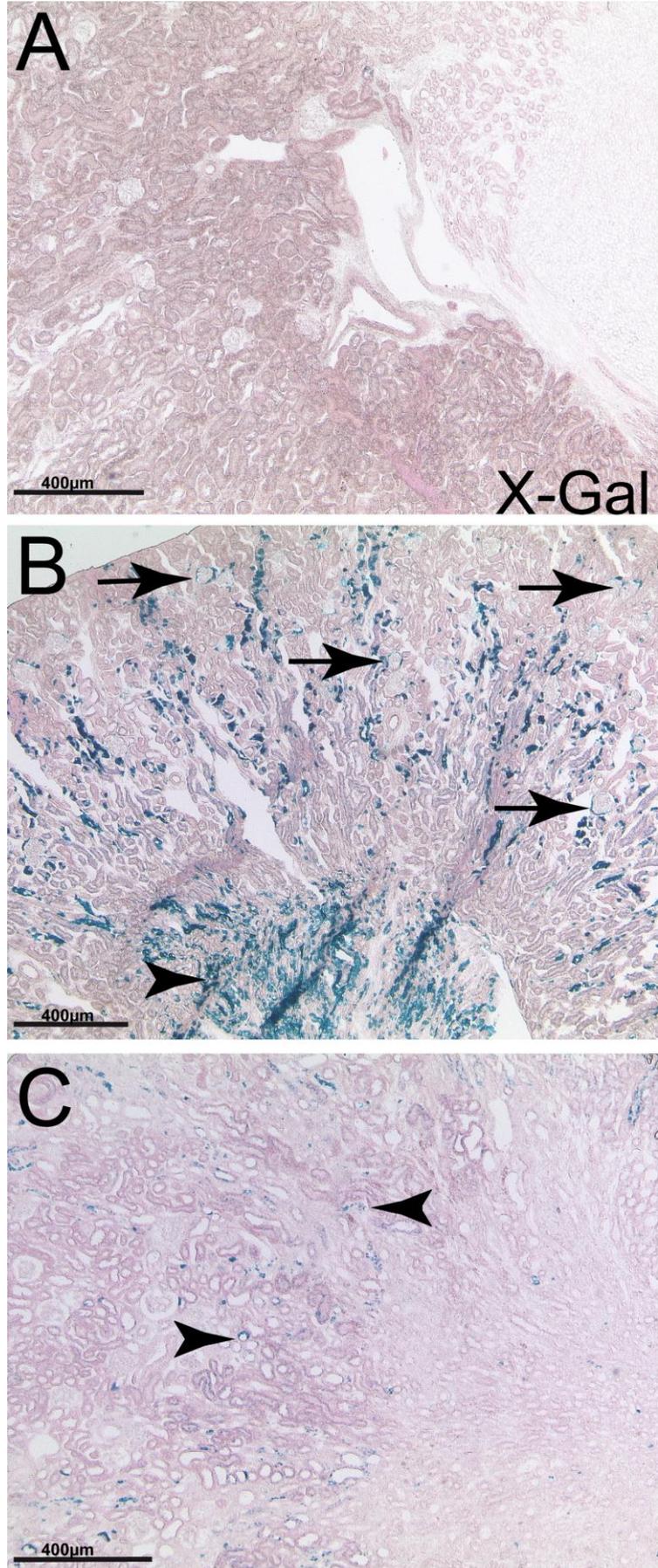
Falls nicht anders gekennzeichnet repräsentieren die Balken 50  $\mu$ m.

Ein weiterer Hinweis auf die Funktionalität des transgenen Mausmodells lieferte der TUNEL-Assay (TUNEL= „terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nickend labeling“) (Honjo et al. 1968; Mitamura et al. 1995). Dieser Assay markiert DNA-Fragmente, wie sie typischerweise im Rahmen des Zellunterganges bei Behandlung von Zellen mit DTA entstehen. In der Immunfluoreszenz-Markierung erwies sich zu jedem Zeitpunkt der Behandlung mit Doxzyklin eine Subpopulation an

*Glomerula* als TUNEL-positiv. Dieser Befund konnte vor allem in den Kernen der Parietalzellen (Abb. 3.3. A+A', hier: Tag 9) detektiert werden. In den nicht behandelten Kontrolltieren und auch in den Nieren der Tiere, die nach Ende der Doxyzyklinbehandlung getötet wurden, konnten keine TUNEL-positiven Parietalzellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3.3: Nachweis der Funktionalität des transgenen Ablationsmodells (A-A')** TUNEL-Assay 9 Tage nach Beginn der PEC-Ablation. (A) Ein Teil der *Glomerula* zeigt TUNEL positive Parietalzellen (Pfeile), während andere *Glomerula* völlig TUNEL-negativ sind (Pfeilspitzen). Einzelne Tubuluszellen sind ebenfalls TUNEL-positiv (Pfeil mit Befiederung). (A') Vergrößerung des markierten Bereiches aus (A). Parietalzellen enthalten fragmentierte DNA (Pfeil, männliche Maus). (B) Quantifizierung der Pax-8 (paired-box gene 8)-positiven Zellen pro *Glomerulum* zu verschiedenen Zeitpunkten (n=3 pro Zeitpunkt, 50 *Glomerula* pro Maus in je einem Schnitt). Insgesamt werden ca. 30% der Parietalzellen (PECs) auferiert. Jeder Balken stellt den Mittelwert ± SD dar, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 (C) Beispielbild eines Pax-8-gefärbten *Glomerulum*. Die Zellen mit dem ovalen Nucleus und dem flachen Zytoplasma (Pfeile) wurden als Parietalzellen gezählt. Die kubischen Tubuluszellen auf der Bowman-Kapsel wurden nicht mitgezählt (Pfeilspitzen; männliches Tier). Falls nicht anders gekennzeichnet, repräsentieren die Balken 50 µm.



**Abb. 3.4: X-Gal-Färbung** von Nieren aus Mäusen mit verschiedenen Transgen Kombinationen. (A) Negativkontrolle. Wildtypmaus (für DTA und LacZ), die 14 Tage mit Doxyzyklin behandelt wurde, Kontrollgruppe 1. Die Färbung ist vollständig negativ. (B) Positivkontrolle, die das Expressionsmuster des ROSA-Promotors zeigt. Färbung der Niere einer Maus, die DTA-negativ aber LacZ-positiv ist, Kontrollgruppe 2. Man sieht, dass vor allem Parietalzellen (Pfeile), aber, wie erwartet, auch Tubuluszellen in Teilen des Kortex und im Bereich der Papille blau gefärbt sind (Pfeilspitzen). (C) Niere einer der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsmäuse, die alle 4 Transgene trägt nach 14-tägiger Doxyzyklinbehandlung. Nur vereinzelte blaue Tubuluszellen sind noch sichtbar (Pfeilspitzen). Die Balken repräsentieren 400  $\mu\text{m}$ .

Nachfolgend sollte semiquantitativ nachgewiesen werden, dass die Zahl der Parietalzellen im Verlauf der Doxyzyklinbehandlung tatsächlich abgenommen hat. Dazu wurde eine immunhistochemische PAX-8-Färbung durchgeführt. PAX-8 („paired box gene 8“) ist ein Transkriptionsfaktor, der permanent in den Parietalzellen der *Glomerula*, sowie einigen Tubuluszellen exprimiert wird, nicht aber in Podozyten (Ohse et al. 2009; Ozcan et al. 2011). Es wurde die Anzahl der PAX-8-positiven Zellkerne pro *Glomerulum* ermittelt, indem 50 *Glomerula* pro Maus, und drei Mäuse pro Zeitpunkt ausgezählt wurden (in je einem Gewebeschnitt). Da im *Glomerulum* der Maus (vor allem in den *Glomerula* der männlichen Tiere) neben den flachen Parietalzellen mit ihrem ovalen Kern auch kubische proximale Tubuluszellen mit eher rundlichem Kern liegen, wurden nur die flachen PAX-8-positiven Zellkerne gezählt (Abb. 3.3 C).

Im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe (Tag 0: 3,6 ( $\pm$  4,8) PECs/*Glomerulum*) zeigt sich eine Abnahme der Pax-8 positiven Parietalzell-Gesamtzahl von ca. 30% über die Zeit der Doxyzyklinbehandlung (Tag 4: 2,5 ( $\pm$  0,2) PECs/*Glomerulum*; Tag 9: 2,2 ( $\pm$  0,28) PECs/*Glomerulum*). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass insgesamt nur 30% der *Glomerula* überhaupt Veränderungen im Phänotyp zeigen, lässt sich sagen, dass in diesen betroffenen *Glomerula* ein deutlich größerer Verlust von Parietalzellen zu verzeichnen ist. So kann man von 50-90% Parietalzellablation pro betroffenem *Glomerulum* ausgehen. Das heißt, dass die *Glomerula*, die einen Phänotyp zeigen, mindestens die Hälfte ihrer Parietalzell-Ausgangszahl verloren haben. Nachdem die Behandlung mit Doxyzyklin beendet wurde, nahm die Zahl der Pax-8-positiven Parietalzellen pro *Glomerulum* wieder zu (Tag 14: 2,3 ( $\pm$  0,3) PECs/*Glomerulum*; Tag 26: 3,8 ( $\pm$  0,61) PECs/*Glomerulum*; Tag 40-42: 2,5 ( $\pm$  0,2) PECs/*Glomerulum*). Der Höhepunkt der Zunahme der Parietalzellen war an Tag 26 nach Beginn der Ablation zu

verzeichnen (Abb. 3.3 B). Diese Zunahme der Parietalzellen war zum Teil verantwortlich für das Entstehen der extrakapillaren Proliferationen in den betroffenen *Glomerula* späterer Untersuchungszeitpunkte. Weitergehend wurde sich das vierte Transgen der PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Maus für die Bestätigung der Funktionalität der Parietalzellablation zu Nutze gemacht. Da nach Doxyzyklingabe in den vierfach transgenen Tieren nicht nur das DTA unter dem ubiquitären ROSA-Promotor in den Parietalzellen exprimiert wird, sondern ebenfalls  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ), die sich durch eine X-Gal-Färbung blau darstellen lässt, wurde diese Färbung auf Cryo-Schnitten von Nieren aus Mäusen mit verschiedenen genetischen Konstrukten durchgeführt. Diese Methode lieferte einen weiteren Hinweis auf die Funktionalität des entwickelten PEC-Ablations-Modells. In den Nieren von dreifach transgenen Mäusen, die LacZ-transgen, aber DTA-Wildtyp waren, das heißt, die nach Doxyzyklingabe die Zielzellen blau färbten, aber nicht auferierten, ließ sich das Expressionsmuster des Promotors erkennen. In dieser Positivkontrolle zeigte sich, dass viele Parietalzellen blau gefärbt waren, aber, wie erwartet, auch Teile des Tubulussystems (vor allem im Bereich der Papille) (Abb. 3.4 B). Als Negativkontrolle dienten Mäuse, die weder LacZ-, noch DTA transgen waren. Das heißt, dass in diesen Tieren nach Doxyzyklinbehandlung die Zielzellen weder DTA noch  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten. Die X-Gal-Färbung war somit in den Nieren dieser Tiere negativ (Abb. 3.4 A). Zusätzlich wurden vierfach transgene Versuchsmäuse verwendet. Nach 14 Tagen Doxyzyklinbehandlung zeigten sich in der X-Gal-Färbung der Nieren lediglich vereinzelte Tubuluszellen positiv (Abb. 3.4 C).

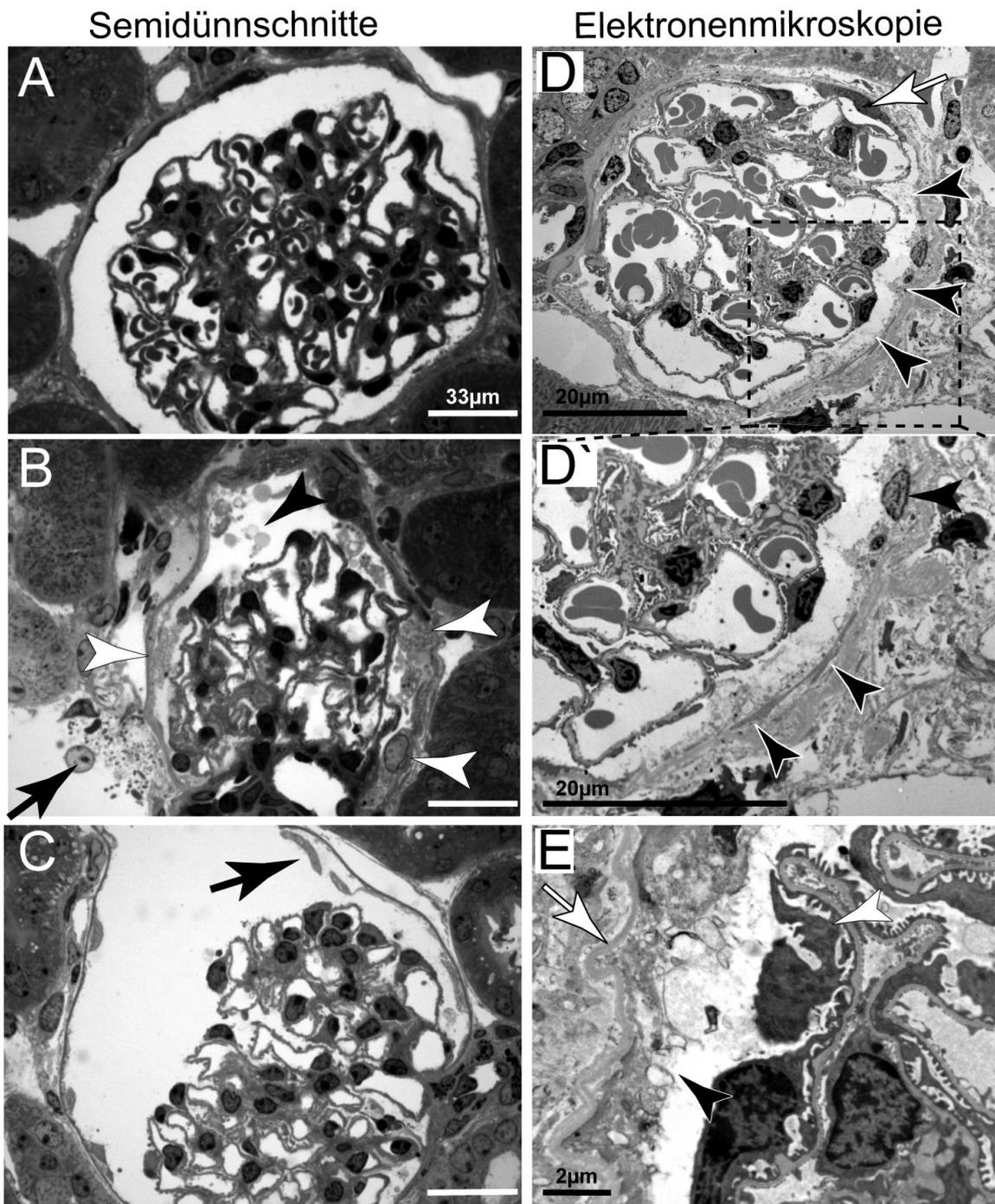
Schließlich wurden ultrastrukturelle Analysen zum Nachweis der erfolgreichen Ablation der Parietalzellen in dem hier verwendeten Tiermodell vorgenommen. Dazu wurden zum einen Semidünnschnitte hergestellt, die sich lichtmikroskopisch untersuchen ließen. Zum anderen wurden die Nierengewebe, die besonders interessant waren, also insbesondere die Nieren der Mäuse, die an Tag 9 der Ablation getötet wurden, für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) aufbereitet und mit Hilfe dieser Technik untersucht.

In den Semidünnschnitten bestätigten sich die Ergebnisse der Immunhistochemie. Viele *Glomerula* zeigten keine Auffälligkeiten und nur ungefähr 30% der *Glomerula* wiesen deutliche, durch die Ablation hervorgerufene, morphologische Veränderungen

auf. In diesen betroffenen *Glomerula* konnten, wie ebenfalls bereits in der PAS-Reaktion, mit Protein gefüllte Bowman'sche Räume und abnorme Parietalzellen, die sich in Auflösung befanden oder aussahen, als würden sie den Kontakt zu ihrer Basalmembran (= Bowman-Kapsel) verlieren, detektiert werden. Auch hier zeigte sich an Tag 9 der Phänotyp mit den deutlichsten Veränderungen hinsichtlich der PEC-Anordnung und Morphologie (Abb. 3.5 A-C). Die TEM-Aufnahmen, als sicherste Bestätigung dafür, dass die partielle Ablation der Parietalzellen erfolgreich war, zeigten an Tag 9 *Glomerula*, die Parietalzellen beinhalteten, die sich in Auflösung befanden. So konnte in diesen Zellen keine deutliche apikale Plasmamembran mehr erkannt werden und die Zellorganellen standen in direktem Kontakt zum Bowman'schen Raum. Fast alle Zellorganellen inklusive des Zellkerns waren aber noch deutlich zu erkennen. Die Bowman-Kapsel, also die Basalmembran der Parietalzellen, war auch „unterhalb“ betroffener Parietalzellen intakt. Allerdings stellte sie sich uneben dar (Abb. 3.5 D-E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das in dieser Arbeit untersuchte vierfach transgene Mausmodell durch eine partielle, etwa 30% Ablation der glomerulären Parietalzellen nach Induktion durch Doxyzyklin charakterisieren ließ.

**Abb. 3.5: Untersuchung der Ultrastruktur der *Glomerula*.** (A-C) Semidünnschnitte (A) Normales *Glomerulum* 9 Tage nach Induktion der Ablation. (B) Zellreste (schwarze Pfeilspitze) und Protein im Bowman'schen Raum an Tag 9 nach Start der Dox-Applikation. Parietalzell-Reste bedecken das innere Blatt der Bowman-Kapsel (weiße Pfeilspitzen). Im angrenzenden *Glomerulum* sind ebenfalls Zellreste zu erkennen (Pfeil). (C) Die Parietalzellen lösen sich teilweise von der Bowman-Kapsel (Pfeil). (D-E) Transmissions-Elektronenmikroskopie (D+D') eines *Glomerulum* 9 Tage nach Induktion der Parietalzellablation. Eine intakte Parietalzelle (weißer Pfeil) ist flankiert von sich auflösenden Parietalzellen (schwarze Pfeilspitzen, D' ist eine Vergrößerung des markierten Ausschnitts in D). (E) In dieser stärkeren Vergrößerung ist die apikale Plasmamembran der Parietalzellen nicht mehr zu erkennen. Die zellulären Bestandteile inklusive der Zellorganellen haben direkten Kontakt zum Bowman'schen Raum (Pfeilspitze). Die Bowman-Kapsel (das heißt die Basalmembran der Parietalzellen) zeigt sich gewellt, aber intakt (weißer Pfeil). Alle Tiere sind acht Wochen alt, weibliche Mäuse in A, C, D und männliche Mäuse in B und E). Falls nicht anders gekennzeichnet, repräsentieren die Balken 33 µm.



### 3.2 DIE PARTIELLE ABLATION DER GLOMERULÄREN PARIETALZELLEN GEHT MIT EINER PROTEINURIE EINHER

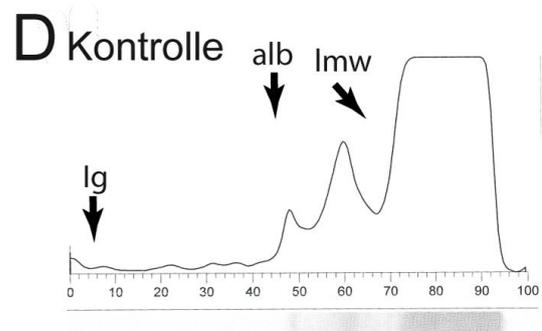
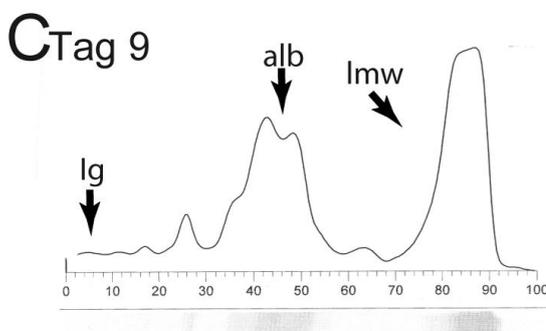
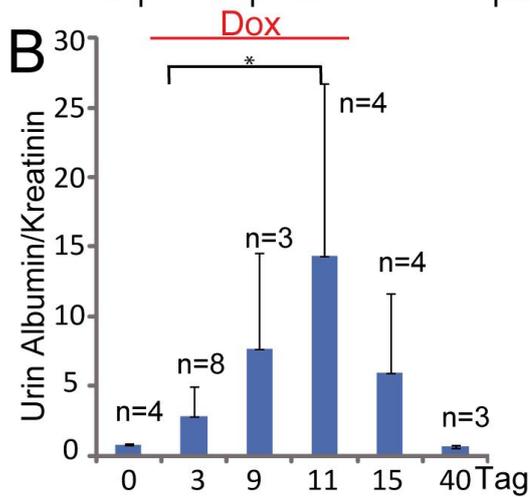
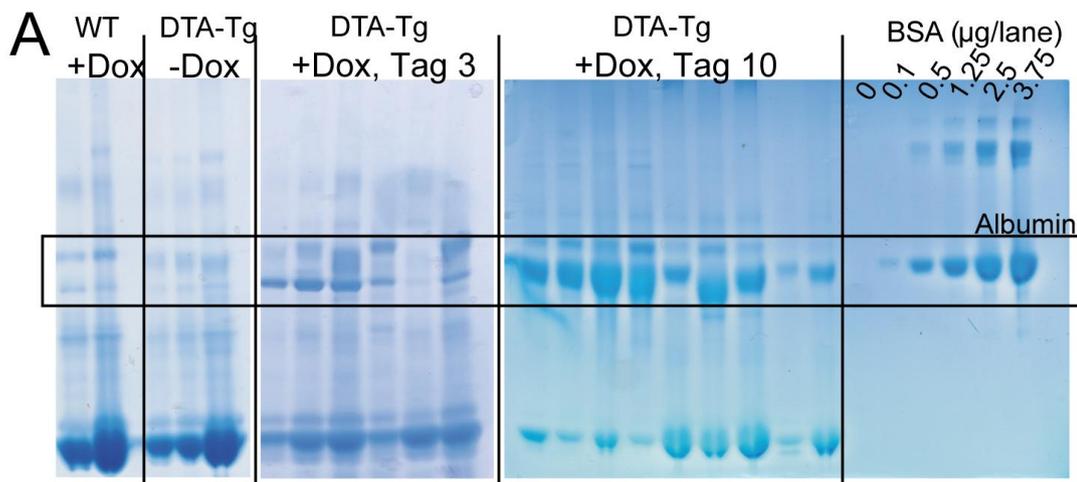
Zur Abklärung der Frage, ob die partielle Ablation der Parietalzellen die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflusst haben könnte, wengleich die Parietalzelle

nicht direkt am Prozess der Filtration beteiligt ist, wurde Urin von den Versuchstieren zur Erfassung einer Proteinurie gesammelt. Die Tiere wurden zur kumulativen Urinsammlung zu verschiedenen Zeitpunkten der Dox-Behandlung für 17 Std in die bereits unter 2.2.3.1 beschriebenen Metabolismus-Käfige gesetzt. Eine mit je 5  $\mu$ l der verschiedenen Urinproben beladene, Coomassie-gefärbte SDS-Page zeigte, dass in den Urinproben DTA-negativer Wildtyp-Mäuse (Kontrollgruppe 2), die 14 Tage lang mit Doxyzyklin behandelt wurden, elektrophoretisch kein Albumin detektiert werden konnte (Abb. 3.6 A, WT +Dox). Auch in den vierfach transgenen DTA-positiven Tieren, die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden, also der Kontrollgruppe 1, lag keine Albuminurie vor (Abb. 3.6 A, DTA-tg -Dox). Im Gegensatz dazu ließ sich in vierfach transgenen Tieren bereits drei Tage nach Induktion der Ablation durch Doxyzyklin eine leichte Albuminurie feststellen. An Tag 11 nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung ließ sich eine deutliche Albuminurie detektieren (Abb. 3.6 A). Zum Vergleich wurde eine BSA-Verdünnungsreihe als Standards mit bekannter Proteinmenge aufgetragen. Um daran anschließend die Albuminurie quantifizieren zu können, wurde ein Albumin-spezifischer ELISA mit den gesammelten Urinproben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Kreatininwerte bestimmt, um die Albumin/Kreatinin-Ratio im Urin berechnen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Albuminurie während der Behandlung mit Doxyzyklin kontinuierlich anstieg. Die höchsten Albuminwerte konnten an Tag 11 der PEC-Ablation in den Urinen der vierfach transgenen Mäuse detektiert werden (Albumin/Kreatinin: Tag 0 (Kontrolle): 0,7 ( $\pm$  0); Tag 3: 2,8 ( $\pm$  1,6); Tag 9: 7,7 ( $\pm$  27) Tag 11: 14,35 ( $\pm$  76)). Nachdem die Gabe des Tetrazyklins beendet wurde, sanken die Albuminwerte in den Urinproben wieder auf das Ausgangsniveau (Albumin/Kreatinin: Tag 15: 5,96 ( $\pm$  16,2); Tag 40+: 0,6 ( $\pm$  0,6)). Das zeigte, dass die nur in den vierfach transgenen Versuchstieren vorliegende progressive Albuminurie vollständig reversibel war und ließ den Schluss zu, dass ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der partiellen Ablation der Parietalzellen und dem Auftreten der Albuminurie bestand (Abb. 3.6 B).

Aufgrund der zahlreichen Hinweise auf eine hauptsächlich durch Albumin bestimmte Proteinurie (auch „selektive Proteinurie“) wurde zur weiteren Bestätigung eine Urinelektrophorese mit anschließender Silberfärbung durchgeführt (Beckers et al.

2008). Die Ergebnisse wurden darauf folgend densitometrisch analysiert (repräsentative Beispiele in Abb. 3.6 C und D). Tatsächlich konnten keine großmolekularen Proteine (Ig) in den Urinproben der Versuchstiere detektiert werden (hier Tag 9). Die Positionen von Albumin (alb) und niedermolekularen Proteinen (lmw) zeigten die Selektivität der Proteinurie an.

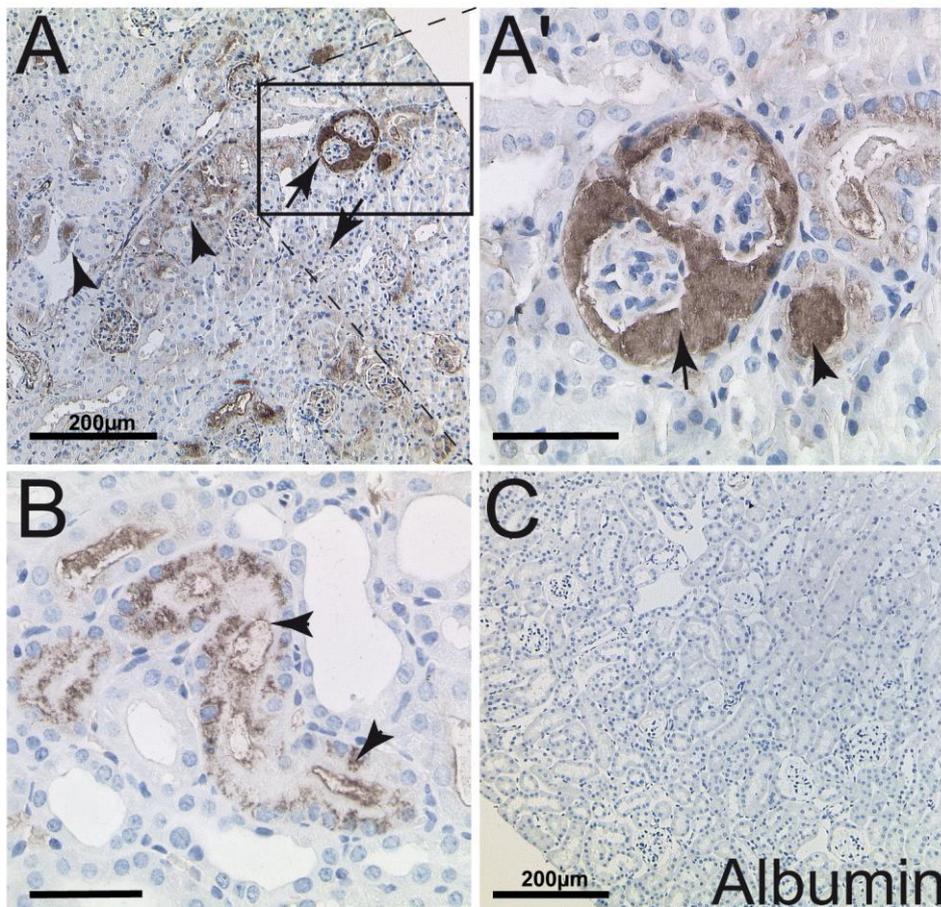


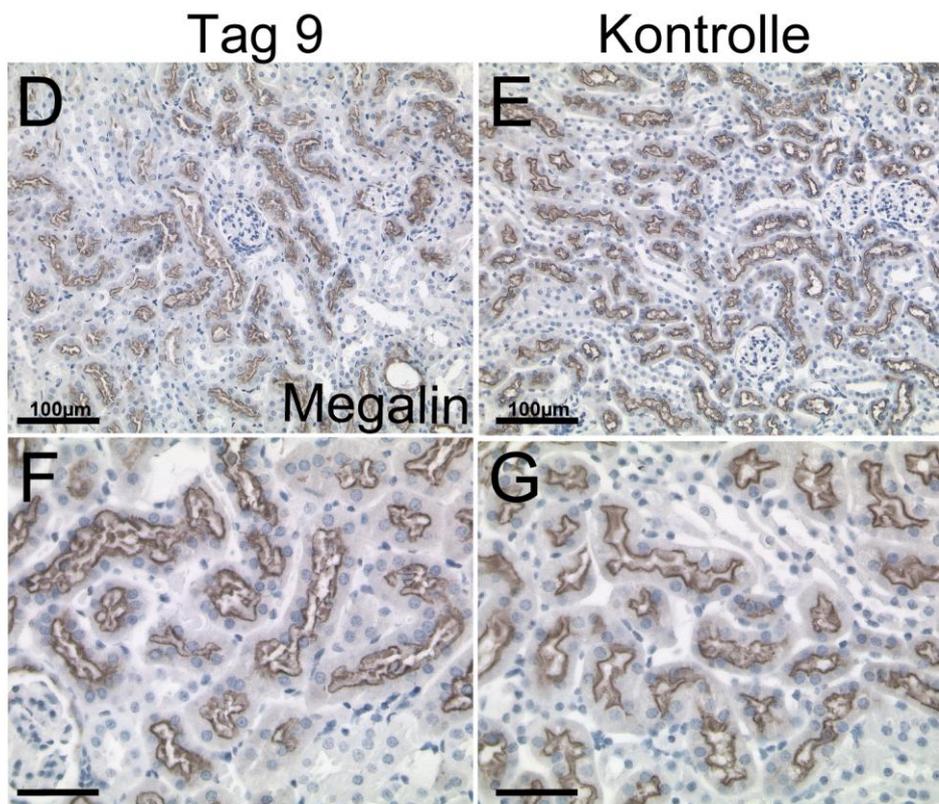
**Abb. 3.6: Parietalzellablation induziert Permeabilitätsdefekte der Filtrationsbarriere.** (A) Elektrophoretische Auftrennung von Urinproben (5 µl) folgender Versuchstiergruppen: Kontrollgruppe 2 (Wildtyp für DTA, 14 Tage Doxyzyklin; WT + Dox), Kontrollgruppe 1 (vierfach transgene Versuchstiere ohne Doxyzyklinbehandlung; DTA-Tg – Dox), vierfach transgene Versuchstiere 3 Tage nach Doxyzyklinbehandlung (DTA-Tg + Dox, Tag 3) und 11 Tage nach Doxyzyklinbehandlung (DTA-Tg + Dox, Tag 10). Färbung der SDS-Page mit Coomassie-Blue. Eine deutliche, progressive Albuminurie ist ausschließlich in Urinproben von Mäusen in der akuten Parietalzell-Ablationsphase (hier: Tag 10) sichtbar (zum Vergleich s. BSA-Standard). (B) Die Albumin/Kreatinin-Ratio wurde aus 17 h Sammelurinen bestimmt. Der Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte zeigt auch hier die progressive Albuminurie nur in Mäusen während der akuten Parietalzellablation (Doxyzyklingabe). Außerdem ist zu sehen, dass die Albuminurie nach Abbruch der Doxyzyklinbehandlung vollständig reversibel ist. (Balken = Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,05$ ) (C+D) SDS-Page von Urinen mit anschließender Silberfärbung (unterer Teil) und densitometrischer Analyse (Graph). (C) Urin von einem Versuchstier an Tag 9. (D) Urin von einem nicht behandelten Kontrolltier (Kontrollgruppe 1). Die Positionen von Ig, Albumin (alb) und niedermolekularen Proteinen (lmw) weisen, im behandelten Tier an Tag 9, auf eine selektive Proteinurie hin.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass durch die subtotalen Ablation der Parietalzellen eine deutliche, selektive Proteinurie auf Grund der Störung der Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere entstanden ist.

Da, wie bereits erwähnt, die Parietalzellen keinen Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere darstellen, wurde weitergehend untersucht, in welchen Komponenten des Nephrons sich eine Albuminurie histologisch nachweisen ließ. Dafür wurde eine immunhistochemische Markierung serieller Gewebeschnitte der murinen Nieren mit gegen Maus-spezifisches Albumin gerichteten Antikörper durchgeführt (Abb. 3.7 A-C). So bestätigte die mikroskopische Analyse die bereits aufgrund der densitometrischen Analyse erhaltenen Ergebnisse. Die Proteinzylinder in den *Glomerula* und verschiedener Tubulusabschnitte waren deutlich Albumin-positiv. Durch den Nachweis von Albumin-Resorptionsvesikeln in einigen proximalen Tubuli konnte von einer intakten Funktion dieses Tubulusabschnittes ausgegangen werden. Die immunhistochemische Markierung der Nieren beider Kontrollgruppen erwies sich als negativ. Um auf eine andere Weise zu bestätigen, dass die endozytische Albuminaufnahme im Tubulussystem nicht durch die Ablation beeinträchtigt, und somit auch nicht mitverantwortlich für die intratubuläre Albuminurie war, wurde eine immunhistochemische Markierung für Megalin an seriellen Nierengewebeschnitten

durchgeführt. Megalin ist ein Rezeptorprotein, das zusammen mit Cubilin ganz wesentlich für die Albumin-Endozytose in proximalen Tubuluszellen verantwortlich ist, ein Mangel führt zu einer Proteinurie (Christensen and Birn 2001; Weyer et al. 2011). Da die immunhistochemische Megalin-Markierung keinen Unterschied zwischen Tag 9 der PEC-Ablation (dem Tag mit den deutlichsten morphologischen Veränderungen in den *Glomerula* und einer ausgeprägten Albuminurie) und den Kontrollnieren zeigte, war davon auszugehen, dass die Albuminurie nicht im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der Funktion des Tubulussystems im Hinblick auf die Albuminresorption stand (Abb. 3.7 D-G).

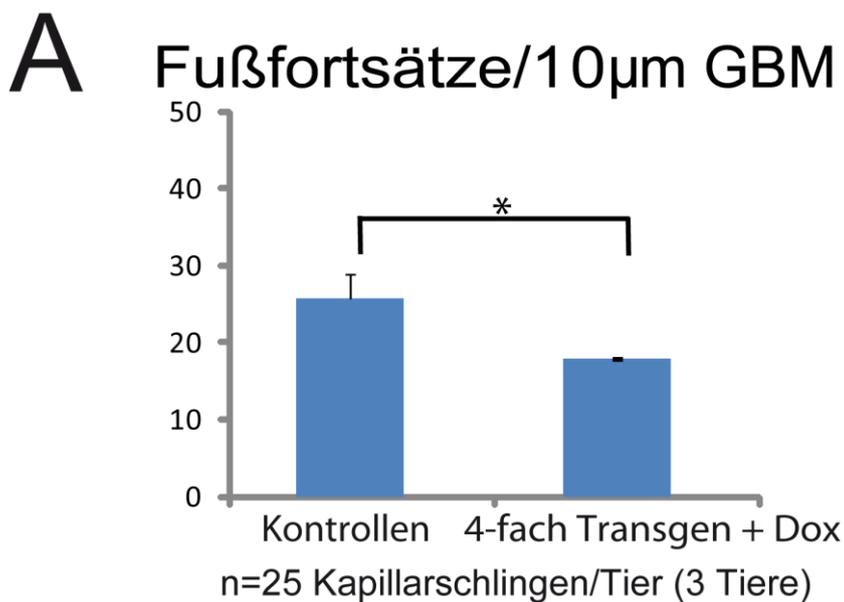


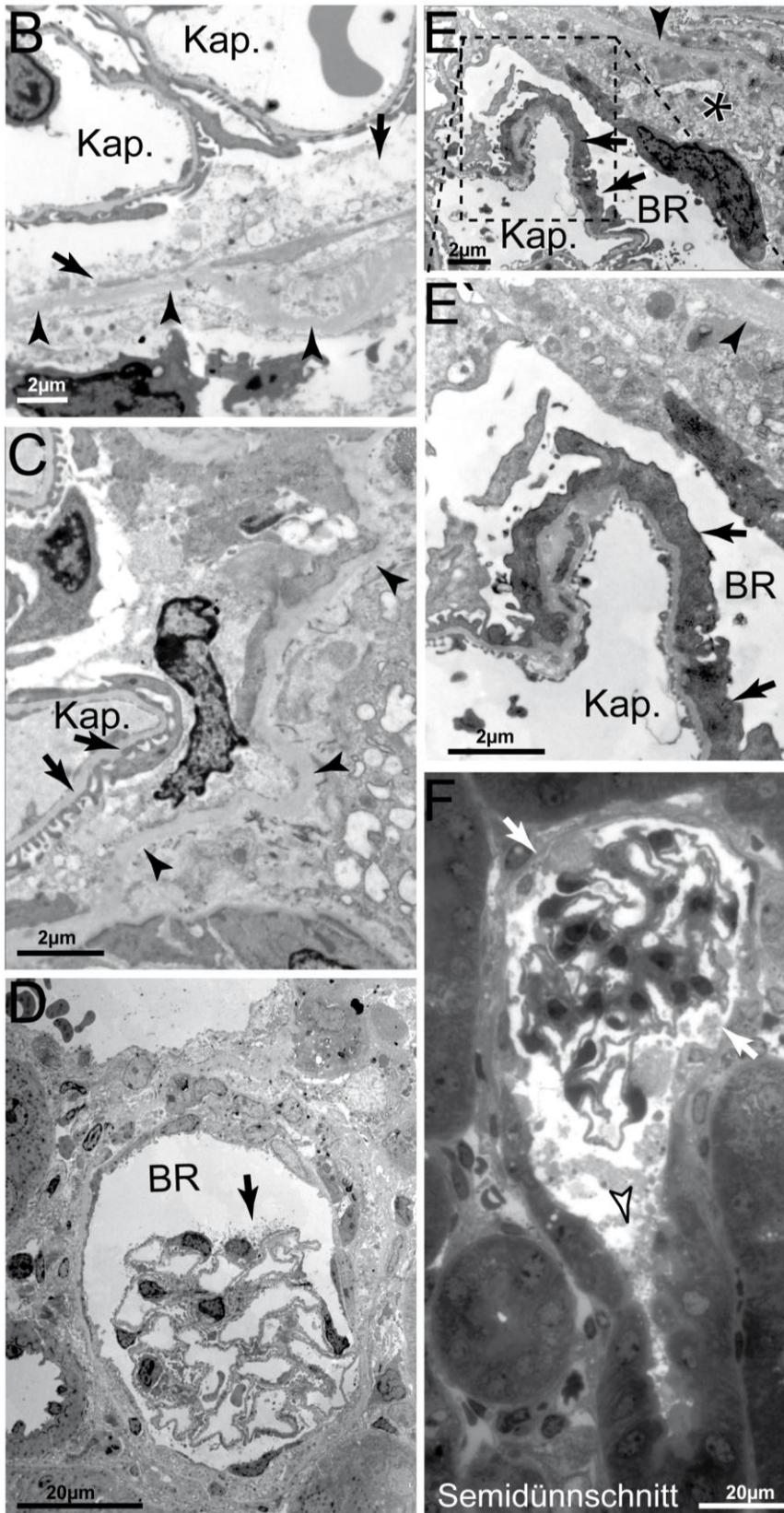


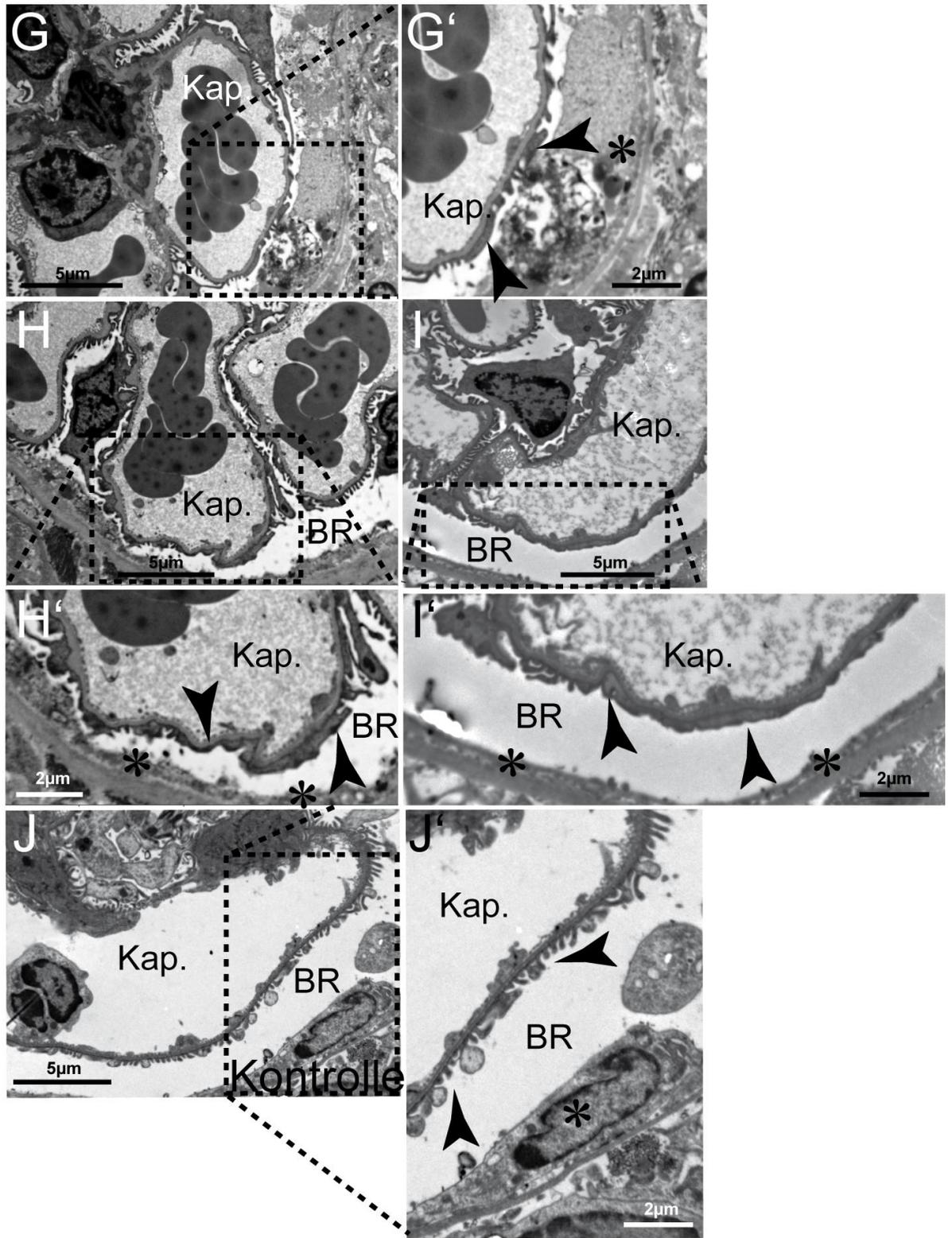
**Abb. 3.7: Parietalzellablation führt zu einer selektiven Proteinurie.** (A-C) Immunhistologische Markierung für Maus Albumin in nicht behandelten Versuchstieren und Versuchstieren an Tag 9 der Behandlung (Hämatoxylin Gegenfärbung; männliche Mäuse). (A und A') Färbung im Bowman'schen Raum und angeschlossenem Tubulus (Pfeile). (B) Deutlich mehr Albumin-Reabsorptionsvesikel in den Tubuli (Pfeilspitzen). (C) Kontrolle (Gruppe 1). (D-G) Megalinexpression in der Niere eines Tieres an Tag 9 (D+F) und eines Kontrolltieres (Gruppe 1) (E+G) (Gegenfärbung: Hämatoxylin). Die Aufnahmen zeigen keinen Unterschied im Megalinexpressionsmuster (männliche Mäuse). Falls nicht anders gekennzeichnet, repräsentieren die Balken 50  $\mu$ m.

Anschließend sollte die Ursache für diese Integritätsstörung der glomerulären Filtrationsbarriere aufgeklärt werden. Der häufigste Grund für das Auftreten einer selektiven Proteinurie stellt die fokale Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten dar. Um nun herauszufinden, ob in den *Glomerula* der Mäusenieren, bedingt durch die Ablation der Parietalzellen, solche Veränderungen auftraten, wurde erneut die Ultrastruktur der *Glomerula* in TEM-Aufnahmen untersucht. In Nierengewebe von je drei Versuchstieren, mit deutlich ausgeprägter Albuminurie und drei gesunden Kontrolltieren, wurde in TEM-Aufnahmen die Anzahl der Fußfortsätze pro 10  $\mu$ m der glomerulären Basalmembran (GBM) ermittelt. Pro Tier wurden je 25 glomeruläre Kapillarschlingen bzw. deren Podozytenbesatz ausgewertet. Bei dieser Untersuchung

von Gewebeschnitten pro Maus konnte tatsächlich eine fokale Verschmelzung der Fußfortsätze bei den mit Doxyzyklin behandelten, vierfach transgenen Mäusen detektiert werden (Abb. 3.8 A). So waren in den glomerulären Kapillargeflechten der Kontrolltiere (2 Tiere aus Kontrollgruppe 1, 1 Tier aus Kontrollgruppe 2) im Mittel  $26,3 (\pm 2,3)$  Fußfortsätze/10  $\mu\text{m}$  GBM vorhanden, während in den Doxyzyklin behandelten vierfach transgenen Mäusen im Mittel nur  $18,3 (\pm 0)$  Fußfortsätze/10  $\mu\text{m}$  GBM gezählt werden konnten. Anhand dieser Auswertung ließ sich also von einer Verschmelzung von ca. 30% der Podozyten-Fußfortsätze bei den PEC-aufgerierten Nieren ausgehen. Eine weitergehende Betrachtung der TEM-Aufnahmen im Hinblick auf die Morphologie der *Glomerula* im Allgemeinen und der glomerulären Epithelzellen im Speziellen zeigte, dass die Fußfortsatzverschmelzung den wichtigsten pathologischen Befund der ansonsten normalen Filtrationsbarriere darstellte (Abb. 3.8 B-F (F = Semidünnschnitt)). Vereinzelt fanden sich darüber hinaus veränderte Podozyten, die z.B. die Bildung von Mikrovilli aufwiesen (Abb. 3.8 D).







**Abb. 3.8: Analyse der Podozyten.** (A) Anzahl der Fußfortsätze pro 10 µm glomerulärer Basalmembran (GBM). Es wurden 25 Kapillarschlingen in 15 Schnitten pro Tier (je drei Tiere pro Gruppe) ausgewertet (Balken = Mittelwert ± SD, \* p < 0,05). Bei den Kontrollen handelt es sich um Nierengewebe beider Kontrollgruppen (B+C). Auch normale Fußfortsätze finden sich in unmittelbarer Nähe zu sich in Auflösung befindenden Parietalzellen (Pfeile). Die Basalmembran der Parietalzellen (Bowman-Kapsel) zeigt sich gewellt, aber intakt (Pfeilspitzen). (D) Fokal zeigt sich Mikrovilli-Bildung einzelner Podozyten, die in den Bowman'schen Raum hineinragen (Pfeil). (E+E') Fokal verstrichene Fußfortsätze (Pfeile) in direkter Nachbarschaft zu einer elektronendichten Parietalzelle, die sich über Zellreste schiebt (Asterisk). Die intakte Bowman-Kapsel ist markiert durch Pfeilspitzen (E' zeigt eine Vergrößerung des markierten Ausschnitts in E). (F) Repräsentativer Semidünnschnitt aus einer Serie (Abb. 3.9: Serienschnitte eines betroffenen *Glomerulum* Abb. 3.9). Hier sieht man ein betroffenes *Glomerulum*, in dem der Bowman'sche Raum mit Zellresten gefüllt ist (Pfeilspitze) und die Parietalzellen sich teilweise in Auflösung befinden (Pfeile). (B-F) männliche Mäuse. (G-I') Exemplarische transelektronenmikroskopische Aufnahmen glomerulärer Kapillaren von Doxyzyklin behandelten, vierfach transgenen Tieren mit deutlicher Albuminurie, in denen verstrichene Fußfortsätze (Pfeilspitzen) in der Nachbarschaft von betroffenen Parietalzellen (Asterisk) zu sehen sind. (J-J') Exemplarische Bilder einer Kontrollniere mit physiologischen Fußfortsätzen (Pfeilspitzen) und einer intakten Parietalzelle (Asterisk). (G', H', I' und J' sind jeweils Vergrößerungen der markierten Ausschnitte in G, H, I und J, männliche Mäuse)

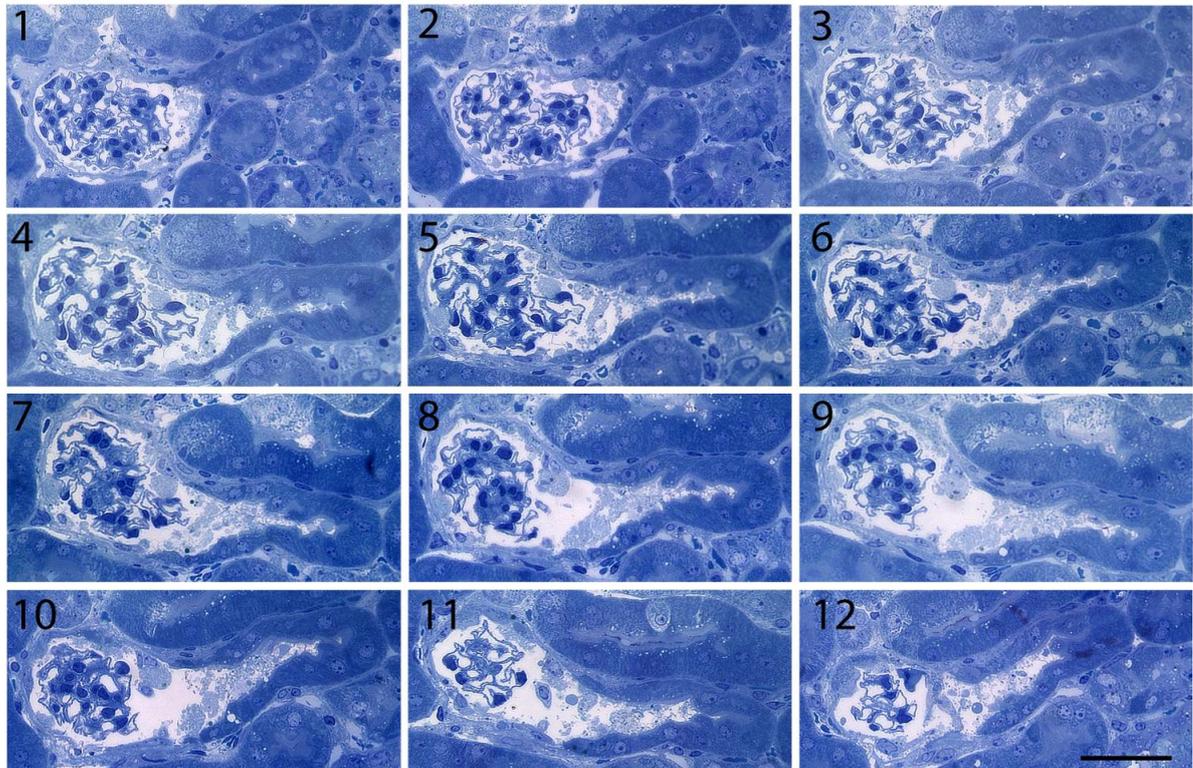
(Kap = Kapillarschlinge, BR = Bowman'scher Raum)

Interessanterweise zeigten sich die podozytären Veränderungen (sowohl die Verschmelzung der Fußfortsätze als auch die Veränderungen einzelner Podozyten) ausschließlich in der Nähe von ebenfalls veränderten oder bereits auferierten Parietalzellen (Abb. 3.8 G-J'), was jedoch nicht bedeutet, dass alle Podozyten in der Umgebung der „sterbenden“ Parietalzellen oder einer unbedeckten Bowman-Kapsel verändert waren (Abb. 3.8 B+C). Die Bowman-Kapsel zeigte sich auch in diesen Aufnahmen teilweise uneben, aber immer intakt.

Um nachfolgend auszuschließen, dass eine akute Obstruktion des proximalen Tubulus, also das Verhindern des Ausflusses des Primärharns, z.B. durch Reste der auferierten Parietalzellen ursächlich für die Veränderungen der Filtrationsbarriere und die dadurch entstandene Albuminurie war, wurden Semidünnschnittserienschnitte von der Niere eines Versuchstiers, das für 9 Tage mit Doxyzyklin behandelt worden war, angefertigt. In diesen Serienschnitten wurden von der Ablation morphologisch veränderte *Glomerula* und deren Harnpol verfolgt (Abb. 3.9). Wie vorher bereits beschrieben, zeigte sich der Bowman'sche Raum der betroffenen *Glomerula* mit Zellresten und Protein gefüllt. Der wichtigste Befund aber war, dass der Harnpol, also die Mündung in den Tubulus, in

allen Ebenen der untersuchten *Glomerula* frei war. Dies war ein erster, wichtiger Hinweis darauf, dass ein Verschluss des Harnpols nicht ursächlich für die pathologischen Veränderungen der *Glomerula* und der daraus folgenden Albuminurie gewesen ist.

### Semidünnschnitte- Serie eines betroffenen Glomerulum (Tag 9)



**Abb. 3.9: Serienschritte eines betroffenen *Glomerulum*** Methylenblau-Färbung von Semidünn-Serienschnitten eines von der Parietazellablation betroffenen *Glomerulum* (Schnittdicke 1 $\mu$ m). Im Bowman'schen Raum befinden sich Zellreste und Protein, bei durchgängigem Harnpol zum proximalen Tubulus (männliche Maus).

Der Balken repräsentiert 50  $\mu$ m.

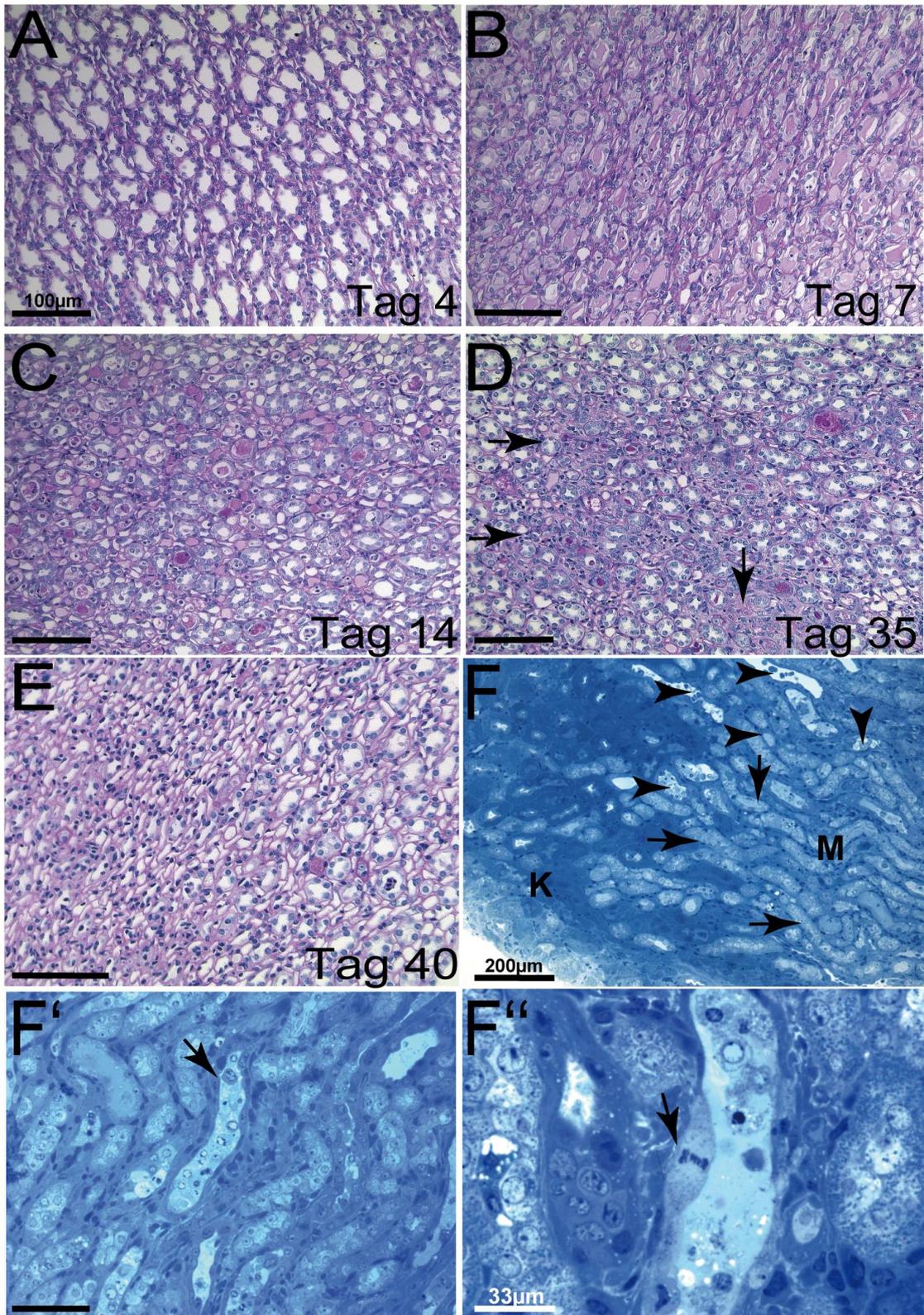
Da bekannt war und auch durch die X-Gal-Färbung bestätigt wurde, dass der Promotor, unter dem die Expression des DTA stattfand, nicht nur in den Parietalzellen, sondern partiell auch in Epithelzellen des Tubulussystems (vor allem im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife) aktiv war, wurde im Folgenden das tubuläre System näher untersucht. Zunächst wurde die pro 24 Std aufgenommene Trinkmenge von 10 vierfach transgenen Versuchstieren, als Parameter für die Fähigkeit zur Konzentrierung des Endharns, während der Induktion der PEC-Ablation bestimmt. Qualitativ konnte ein Anstieg der Trinkmenge zwischen Tag 4 und Tag 6 der Doxzyklinbehandlung

beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das deutete auf Probleme des Tubulussystems hin, den Urin zu konzentrieren, vor allem zu Beginn der Ablation.

In weiterführenden Analysen einer möglichen Schädigung des Tubulussystems wurde zunächst die vorher bereits beschriebene PAS-Reaktion auf Paraffinschnitten verschiedener Ablations-Zeitpunkte im Hinblick auf das tubuläre System näher betrachtet. Da die deutlichsten morphologischen Veränderungen im Bereich der Nierenpapille zu verzeichnen waren, wurde der Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte anhand dieser vorgenommen (Abb. 3.10 A-E). Ähnlich zu den Ergebnissen für die *Glomerula* ließen sich an Tag 4 der Doxyzyklinbehandlung zur Induktion der PEC-Ablation keinerlei morphologische Veränderungen in der Nierenpapille erkennen. Tag 7 zeigte bereits deutlich proteingefüllte Tubuli in der Papille und an Tag 14 ließen sich neben proteingefüllten zusätzlich solche Tubuli detektieren, die Zellreste enthielten. 35 Tage nach Beginn der Ablation ließen sich wenige Areale mit interstitieller Fibrose neben einer sonst unauffälligen Papille ausmachen. Letztlich zeigte sich an Tag 40 nach Ablationsstart eine wieder völlig intakte renale Papille. Nachfolgend wurden auch die Semidünnschnitte im Hinblick auf Veränderungen im Tubulussystem betrachtet (Abb. 3.10 F-F''). Auch hier zeigten sich die Tubuli gefüllt mit Protein und Zellresten. Außerdem ließen sich vereinzelt Tubuli erkennen, in denen sich die Tubuluszellen in Auflösung befanden. Interessanterweise fand man aber in genau diesen Tubulsabschnitten häufig Anzeichen für Zellregeneration (hier in Form einer Mitosefigur, Abb. 3.10 F'').

**Abb. 3.10: Der Phänotyp des tubulären Systems** (A-E) PAS-Reaktion in der renalen Papille zu verschiedenen Zeitpunkten der Ablation. (A) Keine Veränderungen an Tag 4 der Doxyzyklinbehandlung. (B) Nach 7 Tagen Behandlung zeigen sich viele Tubuli proteingefüllt. (C) An Tag 14 sind neben proteingefüllten Tubuluslumina außerdem solche zu erkennen, die zusätzlich Zellreste enthalten. (D) An Tag 35 zeigen sich viele Tubuli normal. Einige Areale mit interstitieller Fibrose sind zu sehen (Pfeile). (E) Tag 40 nach Start der Behandlung mit Doxyzyklin zeigt eine Papille ohne auffällige Veränderungen (Tag 14 und 40 männliche Tiere, sonst weibliche). (F-F'') Methylenblau gefärbte Semidünnschnitte (1µm) einer Niere an Tag 9 der Doxyzyklinbehandlung (männliche Maus). (F) Übergang von Kortex (K) zu Medulla (M). Die Tubuli zeigen sich gefüllt mit Protein (Pfeile) und Zellresten (Pfeilspitzen). (F') In der Vergrößerung sieht man deutlich mit Zellresten (Pfeil) und Protein gefüllte Tubuli. (F'') Eine Mitosefigur in einer Tubuluszelle (Pfeil), die in einem Tubulusabschnitt liegt, der teilweise sich in Auflösung befindende Tubuluszellen enthält.

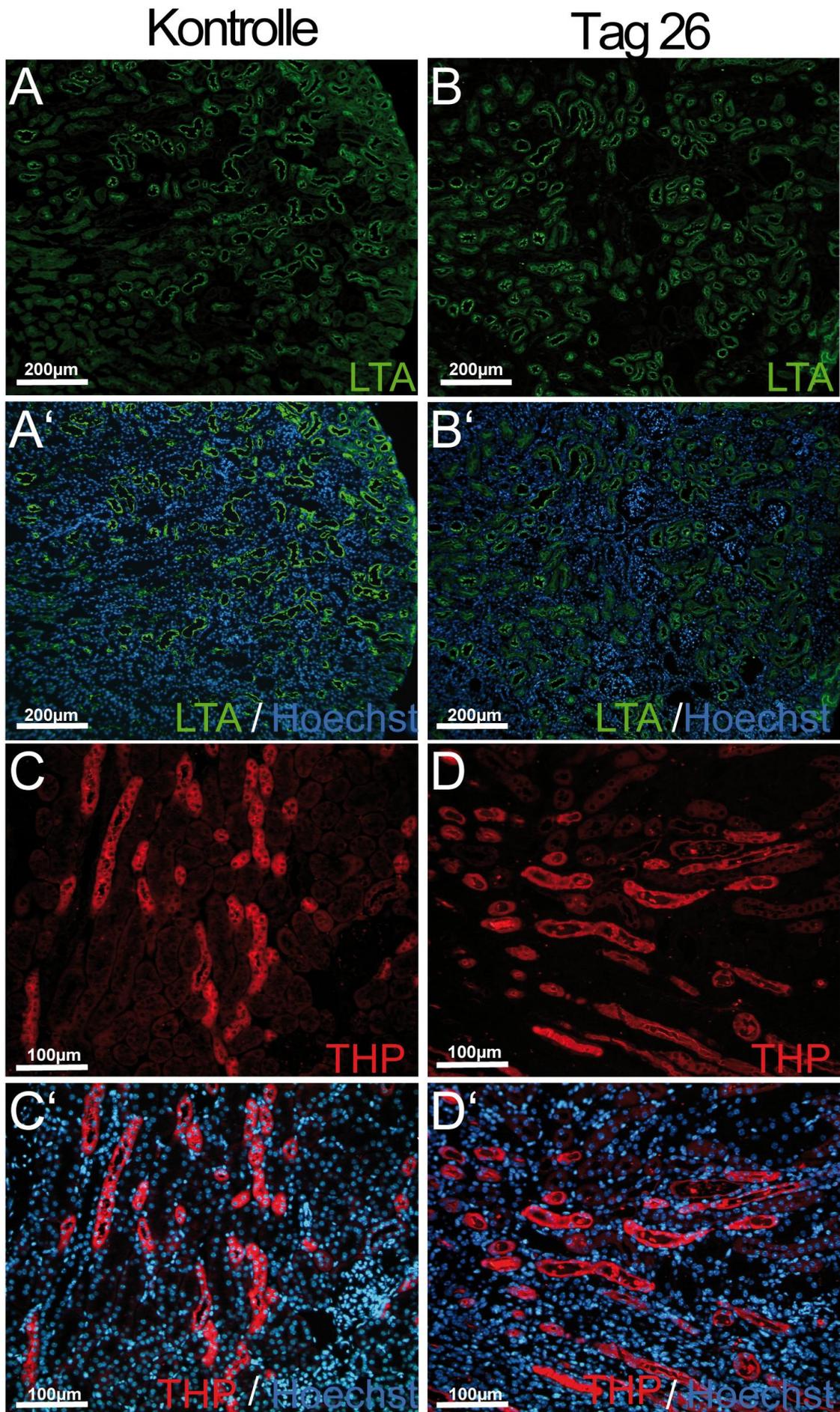
Falls nicht anders gekennzeichnet repräsentieren die Balken 100 µm.



Um im Weiteren festzustellen, welche Tubulusabschnitte in welcher Weise von der Ablation betroffen waren, wurden verschiedene Immunfluoreszenz-Färbungen an Paraffinschnitten durchgeführt. Dazu wurden Antikörper verwendet, die spezifisch sind

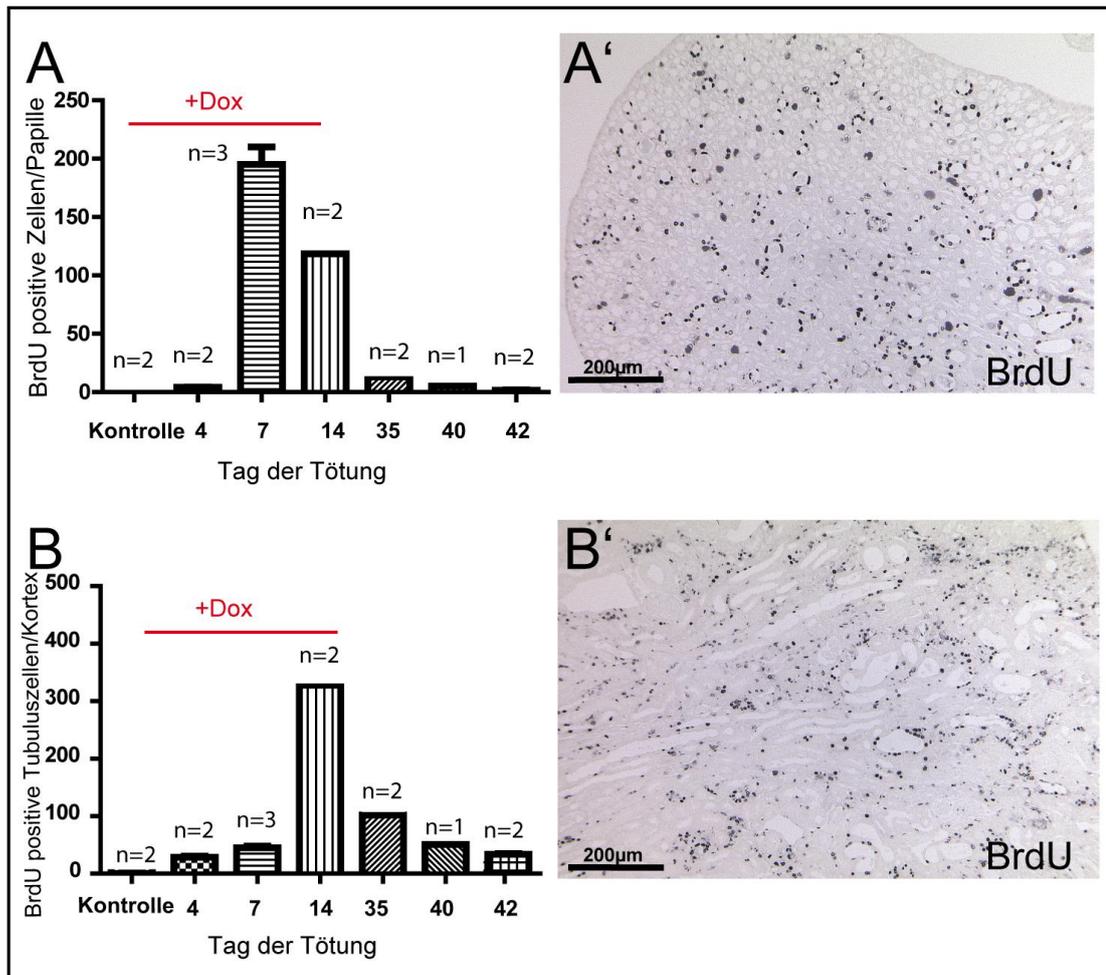
für einzelne Abschnitte des Tubulussystems. Zunächst wurden mit Hilfe von fluoreszierendem LTA (Lektin aus *Lotus tetragonolobus asparagus pea*) die Zellen des proximalen Tubulus immunhistochemisch nachgewiesen. LTA markiert durch die Bindung an Fucose spezifisch Glykoproteine der Zellen des proximalen Tubulus und kann somit als Marker für den proximalen Tubulus verwendet werden (Faraggiana et al. 1982). Die Antigenverteilung in den vierfach transgenen, mit Doxyzyklin behandelten Nieren (hier Tag 26) entsprach derjenigen der Kontrollnieren (Abb. 3.11. A-B'). Für den dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife wurde ein Antikörper spezifisch für THP (Tamm horsfall protein) genutzt (Gokhale et al. 1996). Die immunhistochemische Markierung dieses Uromodulins, das von den Zellen des dicken Astes der aufsteigenden Henle-Schleife gebildet und ins Lumen sezerniert wird, zeigte ebenfalls eine ähnliche Antigenverteilung in Kontrollnieren wie in denen von vierfach transgenen behandelten Tieren (auch hier Tag 26). Allerdings waren hier zusätzlich vereinzelt THP-positive Zellreste in den Tubuli zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass, wie vermutet, der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife derjenige Tubulusabschnitt war, der am meisten von der Ablation betroffen war (Abb. 3.11 C-D').

**Abb. 3.11: Markierung verschiedener Tubulusabschnitte durch Immunfluoreszenz.** (A-B') Markierung von proximalen Tubuluszellen mit Hilfe eines grün fluoreszierenden LTA (*Lotus tetragonolobus*). LTA markiert Glykoproteine, die spezifisch sind für Zellen des proximalen Tubulus. Es sind keine Unterschiede zu erkennen zwischen Versuchstier aus Kontrollgruppe 1 (A-A', vierfach transgenes Tier ohne Doxyzyklinbehandlung; Bild A' = Bild A + Hoechst-Gegefärbung, blau) und behandelten, vierfach transgenen Mäusen (B-B', hier Tag 26 nach Start der Induktion; Bild B' = Bild B + Hoechst-Gegenfärbung, blau). (C-D') THP-Markierung (Tamm horsfall protein, rot; Sekundäntikörper: Dye-light 549 anti-Kaninchen-IgG). THP ist ein Marker für den dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. Auch hier sieht man eine ähnliche Antigenverteilung in der murinen Niere aus Kontrollgruppe 1 (C-C'; C' = C + Hoechst-Gegenfärbung, blau) und der aus einem vierfach transgenen Versuchstier an Tag 26 nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung (D-D'; D' = D + Hoechst-Gegenfärbung, blau). Im behandelten Versuchstier sind teilweise Zellreste in den Tubuluslumina zu sehen (weibliche Mäuse).



Anschließend wurde ein immunhistochemischer Nachweis für BrdU (5-Bromo 2-Deoxyuridin) durchgeführt. Um diese Markierung anfertigen zu können, wurde den Tieren einen Tag vor der Tötung 2x1 mg BrdU gelöst in 200 µl 0,9% NaCl i.p. injiziert. BrdU ist ein chemisches Analogon des Thymidins und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. So konnte mit Hilfe eines spezifischen BrdU-Antikörpers die neu stattgefundenene DNA-Synthese im Tubulussystem nachgewiesen und das Proliferationsverhalten der Niere ermittelt werden (Beispielbilder Abb. 3.12 A' und B')(Pera et al. 1977). Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen wurde in Papille und Kortex getrennt ausgezählt, da, wie bereits erwähnt, ein Unterschied in der Ausprägung der morphologischen Veränderungen in diesen beiden Nierenabschnitten zu sehen war. In beiden Auswertungen konnte eine ähnlich deutliche, relativ kurze Phase zellulärer Proliferation zum Ende der Doxyzyklingabe hin festgestellt werden. Nach Beendigung der Behandlung waren jedoch schnell wieder basale Proliferationszahlen erreicht (Abb. 3.12 A: BrdU pos. Zellen/Papille: Tag 0 (Kontrollen): 0; Tag 4: 6; Tag 7: 210 ( $\pm$  15); Tag 14: 118 ; Tag 35: 13; Abb. 3.13 B: BrdU pos. Zellen/6 Gesichtsfelder des Kortex: Tag 0 (Kontrollen): 0,5; Tag 4: 28; Tag 7: 42 ( $\pm$  2,09); Tag 14: 327; Tag 35: 102). Diese rapide Proliferation war somit vermutlich eine Antwort auf die Veränderungen, die durch die Ablation im Tubulussystem hervorgerufen wurden, und diente möglicherweise dazu, die normale Nierenarchitektur wiederherzustellen.

**Abb. 3.12: Proliferation in Papille und Kortex während der PEC-Ablation.** (A-B') Einen Tag vor der Tötung erhalten die Versuchstiere BrdU-Injektionen (2x 1mg in 200µl 0,9% NaCl) zur Markierung der proliferierenden Zellen. Die BrdU-positiven Zellen werden in Papille (A) und dem renalen Kortex (B) ausgezählt (in jeweils einem Schnitt pro Niere wird die gesamte Papille und bei 40-facher Vergrößerung 6 Gesichtsfelder des Kortex ausgezählt). Eine deutliche und relativ kurze Phase zellulärer Proliferation ist zum Ende der Doxyzyklinbehandlung hin sichtbar. Basale Werte werden nach Ende der Behandlung schnell wieder erreicht. Repräsentative Bilder sind in (A' und B'; weibliche Mäuse) gezeigt. Balken = Mittelwert  $\pm$  SD

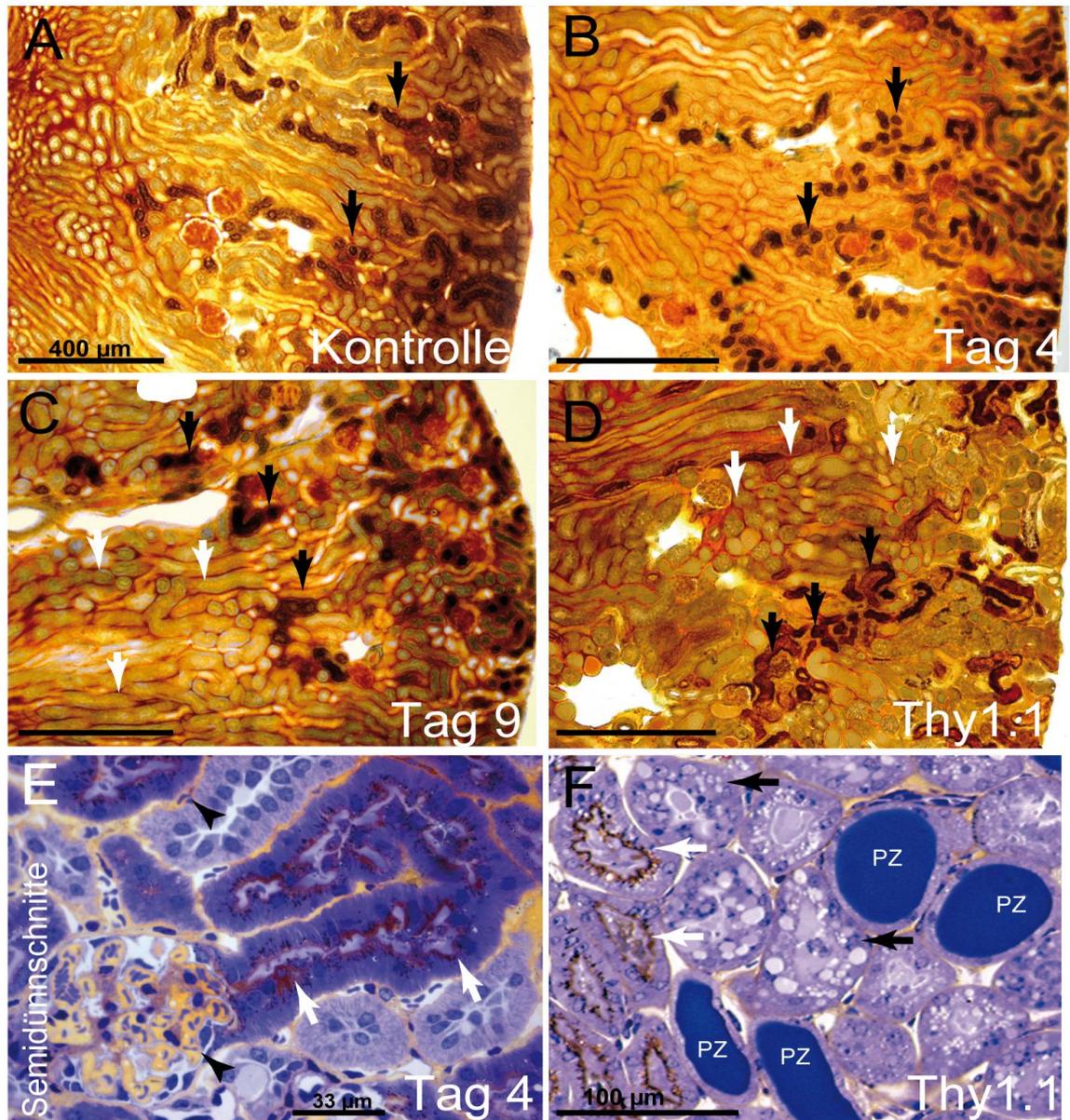


Um durch ein weiteres Experiment zu bestätigen, dass keine Obstruktion im Bereich des Harnpols vorlag, wurde vierfach transgenen Versuchstieren an Tag 4 und Tag 9 nach Beginn der Doozyklingabe Gold-markiertes BSA intravenös injiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht transgene Tiere, die ebenfalls mit dem BSA behandelt wurden. Fünfzehn Minuten nach der Injektion wurden die Mäuse getötet, die Nieren entnommen und für die mikroskopische Untersuchung vorbereitet. Um die Verteilung des Gold-markierten BSAs im Nierengewebe untersuchen zu können, wurden zunächst Dickschnitte (9 µm) hergestellt. An Tag 4 zeigte sich in allen *Glomerula*, dass geringe Mengen des Gold-Tracers in den Primärharn übergegangen waren. Ein ähnliches Bild war in den Nieren der Kontrolltiere zu sehen (Abb. 3.13 A-B). Die braune Färbung in den proximalen Tubuli (Pfeile) entstand durch die Reabsorption des Gold-markierten BSAs durch die Tubuluszellen. An Tag 9 nach Induktion der Ablation zeigten sich diese Reabsorption des markierten BSAs und die daraus resultierende braune Färbung in allen proximalen Tubuli des renalen Kortex (Abb. 3.13 C). Außerdem war der Tracer in den Lumina der distalen Teile des Tubulussystems zu sehen. Als Positivkontrolle wurde

Thy 1.1-transgenen Mäusen (Grosveld and Kollias 1988; Kollias et al. 1987) einen Tag nach Injektion des Thy 1.1-Antikörpers das Gold-markierte BSA injiziert. In diesem Mausmodell wird ein Thy 1.1-Antigen auf den Podozyten exprimiert, so dass nach Injektion eines spezifischen Antikörpers innerhalb von wenigen Stunden eine Proteinurie entsteht. In den Dickschnitten dieser Tiere waren deutlich mit dem markierten BSA gefüllte Tubuli neben solchen, die keine Färbung aufwiesen, zu erkennen. Das ließ auf eine Obstruktion der nicht gefärbten Tubuli durch Proteinzylinder schließen (Abb. 3.13 D). Diese Ergebnisse wurden durch Semidünnschnitte derselben Nierengewebe bestätigt. In den DTA-transgenen Versuchstieren (Abb. 3.13 E, hier Tag 4) konnten Kapillaren detektiert werden, die mit dem Gold-markierten BSA gefüllt waren, so dass davon auszugehen war, dass das BSA noch immer im Blut zirkulierte. Außerdem war zu erkennen, dass der Tracer von den proximalen Tubuluszellen reabsorbiert wurde. Im Gegensatz dazu, zeigte sich das Gold-markierte BSA in den Thy 1.1-Mäusen nur in einigen Tubuli, gekennzeichnet durch die braune Färbung in den proximalen Tubuluszellen (Abb. 3.13 F). Neben diesen markierten Tubuli zeigten sich solche, die in Gänze negativ waren. Die Lumina dieser Tubuli waren geweitet und von Proteinzylindern vollständig verschlossen. Außerdem enthielten in diesen Tieren viele Tubuluszellen Protein-Absorptionsvesikel. Diese Daten ließen darauf schließen, dass, wie bereits vermutet, in den PEC-rtTA/LC1/ROSA26<sup>DTA176</sup>-Mäusen weder 4 noch 9 Tage nach Beginn der Induktion eine Tubulusobstruktion vorlag.

Zu den frühen Zeitpunkten der Ablation zeigten die Tubuluszellen keine Degenerationsanzeichen. Diese beobachtet man typischerweise als Folge einer Unterbrechung der Verbindung von *Glomerulum* und Tubulus (z.B. durch Obstruktion). In den späten Versuchszeitpunkten konnten in den Nieren der Versuchstiere Bereiche mit interstitieller Fibrose festgestellt werden. Aus diesem Grund, und wie in Kapitel 3.4 näher beschrieben, wurde der hier vorliegende Phänotyp des Tubulussystems nicht als direkte Folge einer Tubulusnekrose interpretiert, sondern als sekundäre Degeneration, ausgelöst durch die Bildung zellulärer Halbmonde. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Veränderungen im tubulären System nicht ursächlich für das Auftreten der glomerulären Veränderungen und der selektiven Proteinurie waren, sondern eine Folge dessen.

## BSA-Gold

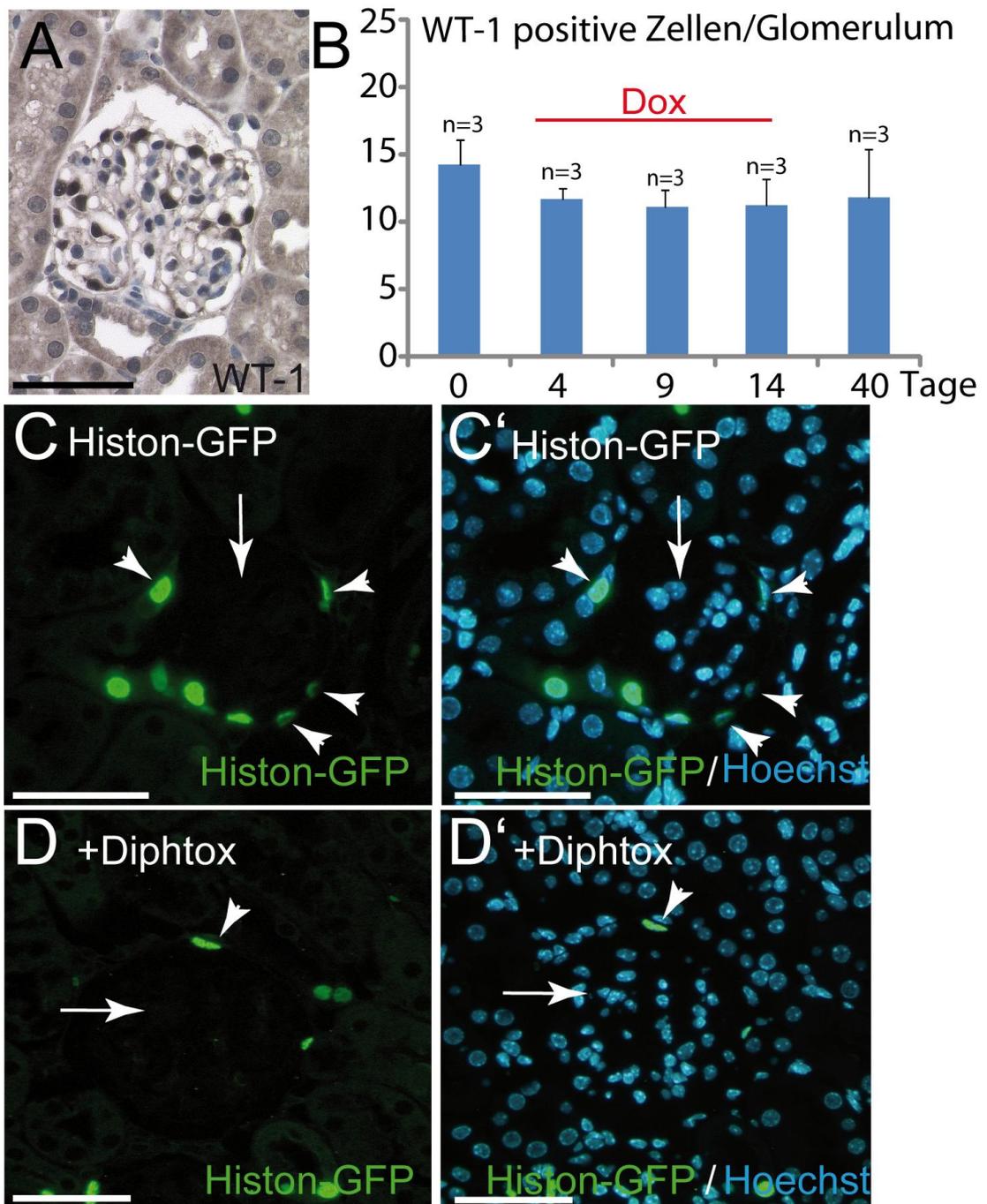


**Abb. 3.13: Gold-markiertes BSA als Tracer zum Nachweis tubulärer Durchgängigkeit.** (A-D) Dickschnitte (9  $\mu\text{m}$ ) der Nieren aus Mäusen denen Gold-markiertes BSA injiziert wurde. (A) Im nicht behandelten Versuchstier aus Kontrollgruppe 1 zeigt sich, dass die BSA-Reabsorption im gewundenen Teil des proximalen Tubulus des Kortex stattfindet (Pfeile, dunkelbraun). (B) Das gleiche Bild zeigt sich in den Nieren der vierfach transgenen Tiere an Tag 4 der Behandlung mit Doxyzyklin (Pfeile). (C) An Tag 9 findet man das dunkelbraun gefärbte Gold-markierte BSA ebenfalls in proximalen Tubuli über den Kortex verteilt (schwarze Pfeile). Wegen der Proteinurie stellt sich das BSA in anderen Tubulsabschnitten grau gefärbt dar (weiße Pfeile). (D) Positivkontrolle für fokale Tubulusobstruktion durch Proteinzylinder: Niere einer Thy 1.1-Maus, einen Tag nach der Injektion des Anti-Thy 1.1-Antikörpers. Dieser Antikörper induziert eine Proteinurie innerhalb von wenigen Minuten. Hier ist die Reabsorption des markierten BSAs nur in einigen proximalen Tubuli (schwarze Pfeile) zu erkennen. Andere Tubuli sind nicht gefärbt (weiße Pfeile). (E-F) Methylenblau-gefärbte Semidünnschnitte (1  $\mu\text{m}$ ). (E) vierfach transgenes Versuchstier, 4 Tage nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung. Die Kapillaren sind mit Gold-markiertem BSA gefüllt (Pfeilspitzen). Auch hier ist zu erkennen, wie es in den proximalen Tubuluszellen reabsorbiert wird (weiße Pfeile). (F) Thy 1.1-transgene Maus. Tubuli, die mit Gold-markiertem BSA gefüllt sind (weiße Pfeile) neben Protein-gefüllten Tubuli, die kein BSA beinhalten, aber Anzeichen von zellulärer Degeneration aufweisen (schwarze Pfeile). Einige Tubuli sind durch Proteinzylinder (PZ) völlig verschlossen (alle Tiere in (A-F) sind 16 Wochen alt und männlich). Falls nicht anders gekennzeichnet, repräsentieren die Balken 400  $\mu\text{m}$ .

Zuletzt sollte ausgeschlossen werden, dass das PEC-rtTA Transgen zusätzlich eine ektopische Ablation der Podozyten ausgelöst haben könnte und so den für dieses Mausmodell charakteristischen Nieren-Phänotyp herbeiführte. Dazu wurde zunächst eine immunhistochemische Markierung für WT-1 durchgeführt. WT-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Podozyten, nicht aber in Parietalzellen exprimiert wird (Beispielbild Abb. 3.14 A) (Ohse et al. 2009). Nachfolgend wurde die Anzahl der WT-1 positiven Zellen pro glomerulärem Kapillarknäuel ausgezählt (3 Tiere pro Zeitpunkt, 50 *Glomerula* pro Tier, 1 Gewebeschnitt pro Tier). Überraschenderweise ließ sich 4 Tage nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung eine leichte Abnahme der WT-1 positiven Zellen feststellen, was mit der Ablation der sog. transitorischen Zellen, die sowohl Parietalzell-, als auch Podozyteneigenschaften haben, zusammenhängen könnte (Appel et al. 2009; Gibson et al. 1992) (Abb. 3.14 B: WT-1 pos.Zellen/Glomerulum: Tag 0 (Kontrollen): 14 ( $\pm 1,8$ ); Tag 4: 11,6 ( $\pm 0,8$ ); Tag 9: 11,1 ( $\pm 1,2$ ); Tag 14: 11,2 ( $\pm 2,0$ ); Tag 40: 11,8 ( $\pm 3,7$ )). Um nun weitergehend zu testen, ob das PEC-rtTA-Transgen nicht nur in Parietalzellen, sondern auch in Podozyten aktiv war, wurde, wie bereits beschrieben, das tetO7-HIST1H2BJ/GFP-Transgen (Tumbar et al. 2008) durch gezielte

Verpaarungen zusätzlich in die verwendete PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Linie eingekreuzt. Dieses Transgen exprimiert induzierbar Histone, die an ein grün fluoreszierendes Protein (Histon-eGFP) gekoppelt sind (Abb. 3.14 C-D). Das Histon-eGFP akkumuliert im Zellkern und persistiert dort. Dieses System ermöglicht es, auch sehr geringe Hintergrundaktivität des PEC-rtTA-Transgens zu detektieren, da das Produkt über die Zeit akkumuliert und die Expression linear hochreguliert werden kann (nicht „an“ oder „aus“ wie es für das ROSA26<sup>DTA176</sup>-Transgen gilt). Die PEC-rtTA/LC1/tetO7-HIST1H2BJ/GFP-Mäuse, die kein ROSA26<sup>DTA176</sup> trugen, wurden nun mit Doxyzyklin behandelt. In diesen Tieren zeigte sich dann eine Akkumulation des Histon-eGFPs in fast allen Zellkernen der Parietalzellen (Abb. 3.14 C-C'). In keiner anderen Zelle im *Glomerulum* konnte das Histon-eGFP detektiert werden. Allerdings waren auch hier, wie erwartet, einige tubuläre Epithelzellen positiv. Nach Induktion der Ablation in PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>/tetO7-HIST1H2BJ/GFP Mäusen, also solchen, die das „Selbstmord-Gen“ (= DTA) enthielten, konnte man ebenfalls kein eGFP in Podozyten oder anderen Zellen des *Glomerulum* entdecken. Nur die verbliebenen Parietalzellen zeigten sich positiv (Abb. 3.15 D-D'). Daraus ließ sich schließen, dass es in unserem Modell zu keiner ektopischen Aktivität des PEC-rtTA-Transgens in Podozyten kam.

**Abb. 3.14: Keine ektopische Zellablation im *Glomerulum*.** (A) Repräsentatives Bild einer immunhistochemischen Markierung für WT-1- im *Glomerulum* (weibliche Maus). Nur die Podozyten sind markiert. (B) Anzahl WT-1-positiver Zellen pro *Glomerulum* (3 Mäuse pro Zeitpunkt, je 50 *Glomerula* pro Maus in je einem Gewebeschnitt; Balken = Mittelwert ± SD). (C-C') Unter Doxyzyklingabe zeigt sich in einer vierfach-transgenen Maus, die das tetO7-HIST1H2BJ/GFP trägt, das DTA176 (also das „Selbstmord-Gen“) aber nicht, dass das Histon-eGFP spezifisch in fast allen Parietalzellen exprimiert wird (Pfeilspitzen, Histon eGFP grün (Sekundärantikörper Dye-light 488 anti-Maus-IgG), Hoechst-Gegenfärbung blau). Die anderen Zellen des *Glomerulum* sind nicht positiv (Pfeil). (D-D') Wird die Doxyzyklinbehandlung in fünffach transgenen Tieren durchgeführt, sind deutlich weniger Histon-eGFP immun-positiv Parietalzellen (Pfeilspitze, Tag 5 nach Beginn der Behandlung) zu erkennen. Auch hier sind keine weiteren markierten Zellen detektierbar (Pfeil). (C-D' männliche Mäuse). Die Balken repräsentieren 50 µm.

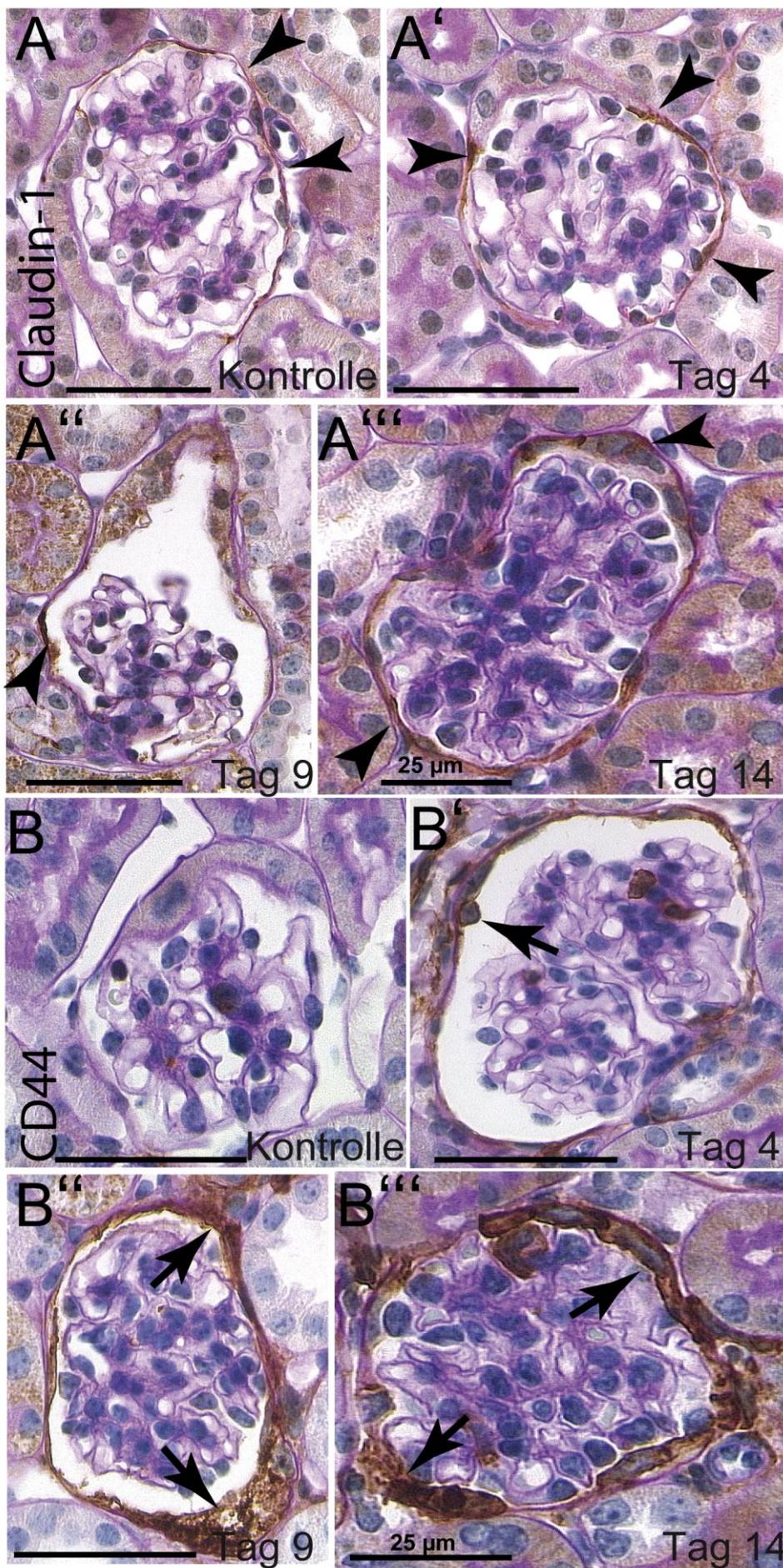


### 3.3 AKTIVIERUNG VERBLEIBENDER PARIETALZELLEN DURCH PARTIELLE ABLATION

In dem hier verwendeten, vierfach transgenen Mausmodell trat die Ablation der Parietalzellen nur fokal auf, so dass im Weiteren untersucht wurde, wie die verbleibenden Parietalzellen auf den Verlust Ihrer Nachbarzellen reagierten. Dazu wurden verschiedene immunhistochemische Nachweise durchgeführt. Zunächst wurde

eine für den PEC-Marker Claudin-1 spezifische Markierung durch Einsatz eines polyklonalen Antiserums in Kombination mit einer PAS-Reaktion angefertigt. Claudin-1 ist ein Protein, das in den tight junctions u.a. der Parietalzellen exprimiert wird (Kiuchi-Saishin et al. 2002). Die PAS-Reaktion wurde zusätzlich angefertigt, um die Morphologie der *Glomerula* besser beurteilen zu können. Es zeigte sich, dass zu jedem Zeitpunkt der Ablation in fast allen *Glomerula* Claudin-1-positive Parietalzellen zu sehen waren (Abb. 3.15 A-A''). Das bedeutete, dass es in keinem *Glomerulum* zu einer vollständigen Ablation der Parietalzellen kam. Außerdem wurde eine immunhistochemische Markierung für CD44 durchgeführt. Dieses Protein ist ein Adhäsionsmolekül, welches von den Parietalzellen gesunder *Glomerula* nicht exprimiert wird. Da eine *de novo* Expression jedoch in den Parietalzellen erkrankter *Glomerula* detektiert werden kann, wird CD44 als sog. Parietalzell-Aktivierungsmarker genutzt (Fatima et al. 2012; Smeets et al. 2009a,b) (ebenfalls in Kombination mit der PAS-Reaktion). Eine *de novo* Expression dieses Markerproteins konnte ab Tag 4 der Doxyzyklinbehandlung in >50% der *Glomerula* detektiert werden (Abb. 3.15 B-B''). Für das Auftreten der aktivierten Parietalzellen im *Glomerulum* gab es keine anatomische Präferenz. Die Intensität der CD44 Expression wurde stärker, je länger die Behandlung mit Doxyzyklin andauerte, was für eine progressive Aktivierung der Parietalzellen spricht. In Kontrolltieren, die entweder nicht mit Doxyzyklin behandelt wurden oder das ROSA<sup>DTA176</sup>-Transgen nicht trugen, wurde keine CD44 Expression festgestellt.

**Abb. 3.15: Aktivierung der verbliebenen PECs während der partiellen Ablation.** Immunhistochemischer Nachweis für den PEC-Marker Claudin-1 (A-A'') und den PEC-Aktivierungsmarker CD44 (B-B'') kombiniert mit der PAS-Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten der Ablation. In den Nieren der Mäuse aus beiden Kontrollgruppen (hier Kontrollgruppe 1 gezeigt) ist lediglich eine positive Markierung für Claudin-1 zu erkennen. Für CD44 sind die Nierengewebe negativ. Das zeigt, dass die PECs unter physiologischen Bedingungen nicht aktiviert sind (A und B, Pfeile). Ab Tag 4 der PEC-Ablation ist die Expression des Aktivierungsmarkers CD 44 sichtbar (Pfeile) in den verbliebenen PECs (Pfeilspitzen). (A',A'',B und B' weibliche Tiere; A,A'', B'' und B''' männliche Mäuse). Falls nicht anders gekennzeichnet, repräsentieren die Balken 50 µm.

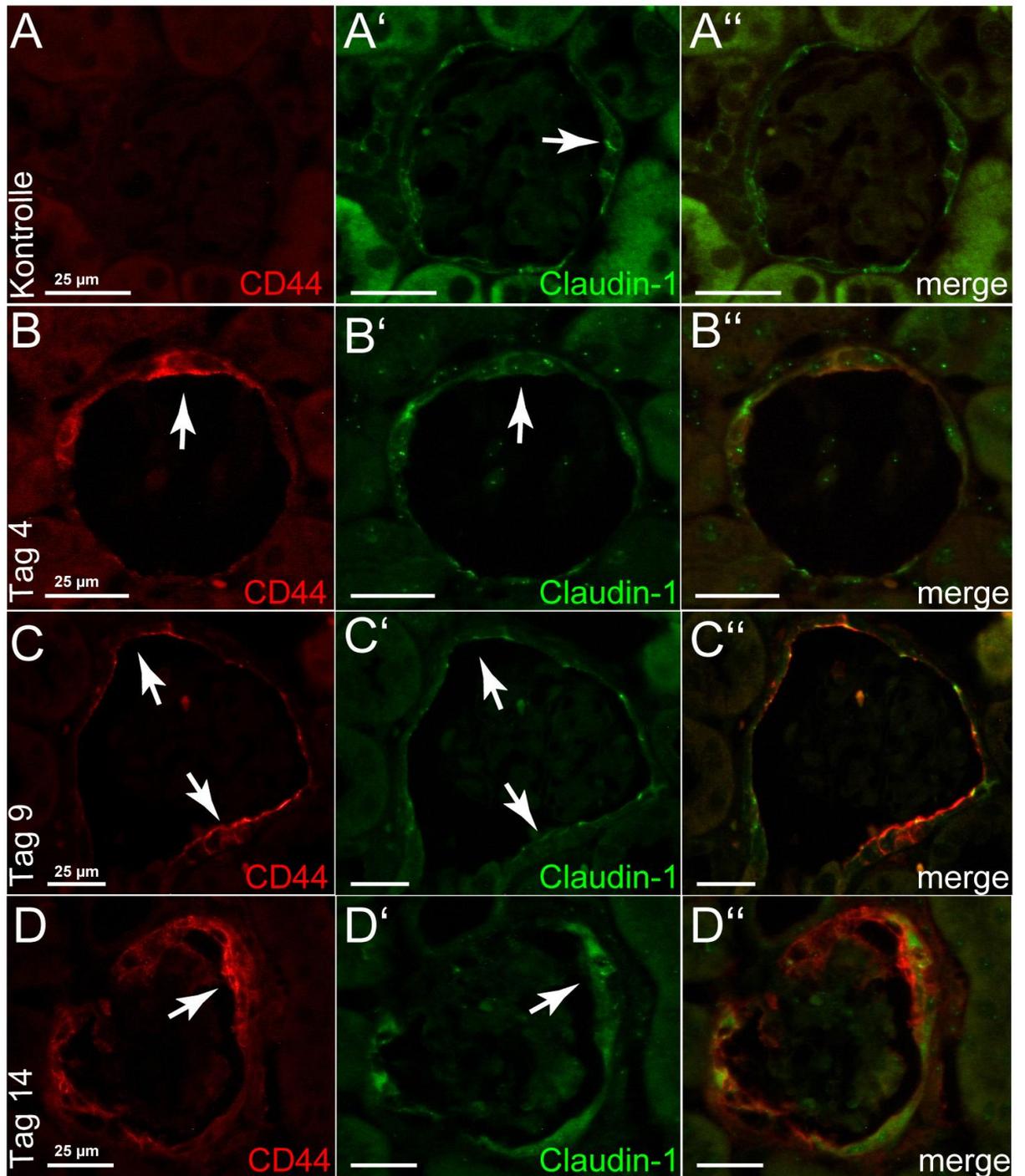


Um diese Ergebnisse mit einer Doppelmarkierung für Claudin 1 und CD44 bestätigen zu können, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb. 3.16). Auch hier zeigte sich, dass während des gesamten Versuchs Claudin-1 von den PECs exprimiert wurde. Der Aktivierungsmarker CD44 konnte ab Tag 4 und zu jedem späteren Zeitpunkt der Induktion der PEC-Ablation in den PECs detektiert werden. Interessant war außerdem, dass in späten Zeitpunkten die zellulären Halbmonde deutlich Claudin-1- und CD44-positiv waren.

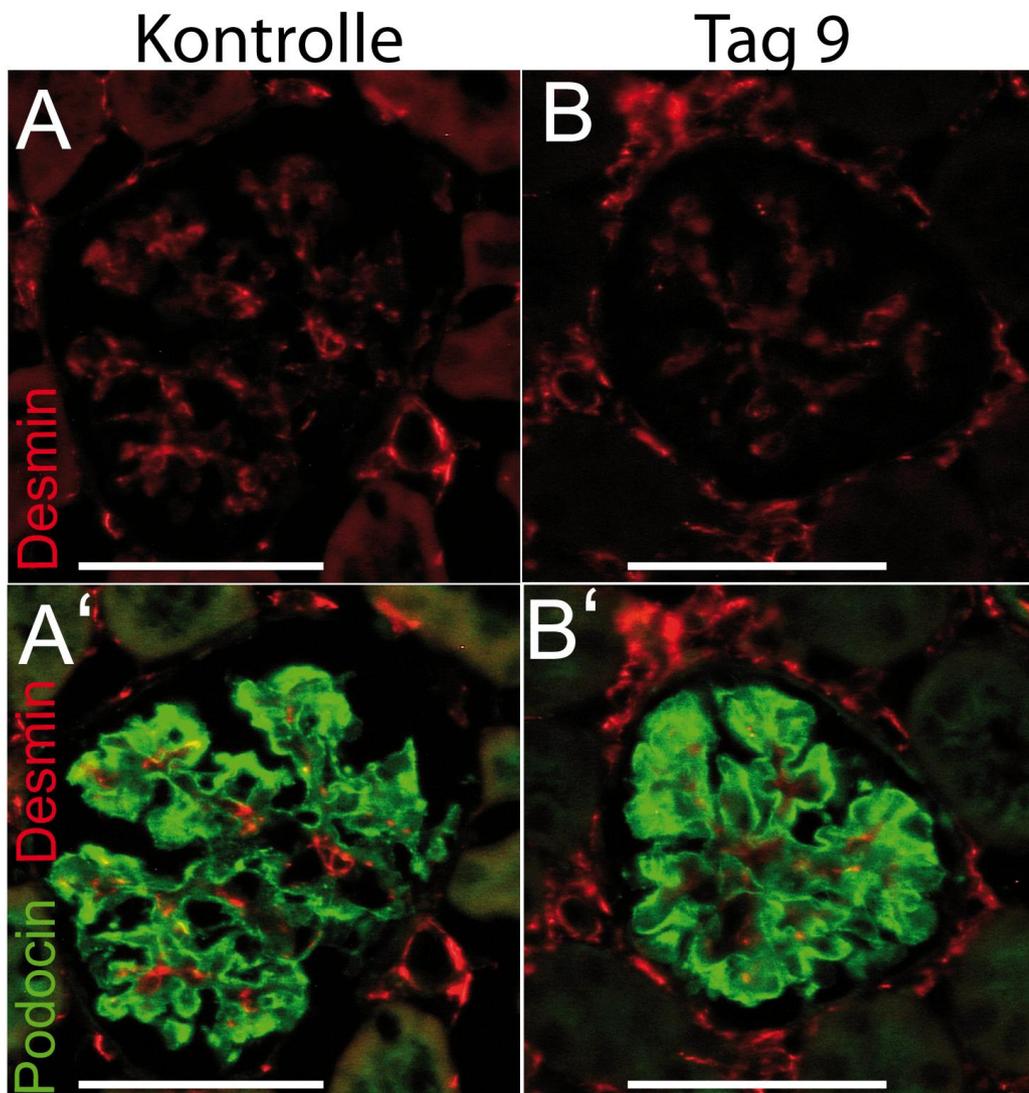
Weitergehend wurde das Verhalten der Podozyten im Bezug auf Aktivierung und Dedifferenzierung untersucht. Dazu wurde eine Immunfluoreszenz-Markierung für die Podozytenmarker Podocin und Desmin durchgeführt. Podocin ist ein membranständiges Protein, das ausschließlich in glomerulären Podozyten exprimiert wird (Roselli et al. 2002). Eine solide Expression dieses Markers für differenzierte Podozyten zeigte sich sowohl in den Tieren beider Kontrollgruppen (Abb. 3.17 A-A', hier Niere einer Maus aus 1) als auch in den vierfach transgenen, mit Doxzyklin behandelten Mäusen zu jedem Zeitpunkt (Abb. 3.17 B-B', hier Tag 9). Auch das Expressionsmuster von Desmin zeigte sich an Tag 9 im Vergleich zu den Kontrollnieren unverändert. Genau wie CD44 in den Parietalzellen, ist Desmin nicht in den Podozyten gesunder *Glomerula* vorhanden. Das Intermediärfilament kann lediglich in Podozyten erkrankter *Glomerula* detektiert werden und wird somit als Aktivierungsmarker für die viszerale Epithelzellen des *Glomerulum* verwendet (Floege et al. 1992; Zou et al. 2006). Lediglich Mesangial- und Endothelzellen stellten sich hier positiv dar (Abb. 3.17). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Podozyten zwar ultrastrukturelle Veränderungen aufwiesen (s. Kapitel 3.2), aber nicht soweit beeinträchtigt waren, dass Zeichen für eine Aktivierung oder Dedifferenzierung zu erkennen waren.

Nachfolgend wurden auch die verbliebenen Parietalzellen im Hinblick auf ihre Ultrastruktur näher untersucht. In TEM-Aufnahmen von Nierengewebe aus Versuchstieren 9 Tage nach Beginn der Ablation waren elektronendichte Parietalzellen auf der Innenseite der Bowman-Kapsel liegend zu erkennen. Entweder lagen sie direkt auf ihrer Basalmembran oder auf den Zellresten der ehemaligen Parietalzellen (Abb. 3.18). Diese verbliebenen Parietalzellen bildeten dünne Zellfortsätze, die die Zellreste der zerstörten Parietalzellen bedeckten und eine neue Basalmembran bildeten. So

waren dichte Akkumulationen von Parietalzellen und/oder Parietalzellen, die mehrere Schichten, also frühe zelluläre Halbmonde, bildeten, zu sehen. Auch hier zeigte sich die Bowman-Kapsel immer intakt und die Verschmelzung der Fußfortsätze war ausschließlich in Bereichen mit veränderten Parietalzellen zu sehen.

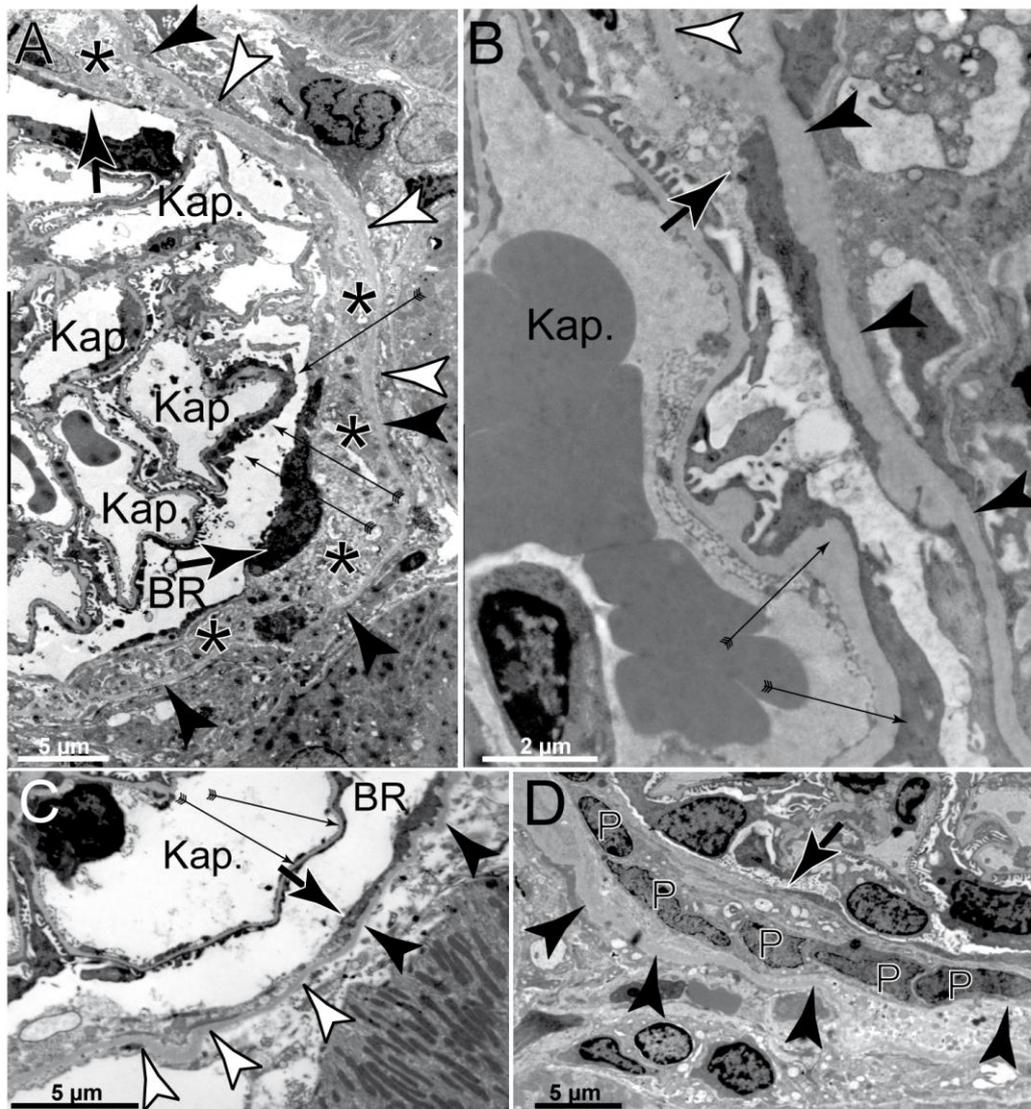


**Abb. 3.16: Aktivierung der PECs während der partiellen Ablation II.** Immunfluoreszenz mittels indirekter Doppelmarkierung für den PEC-Aktivierungsmarker CD44 (rot, Sekundäntikörper: Dye-light 549 anti-Ratte-IgG) und den PEC-Marker Claudin-1 (grün, Sekundäntikörper: Dye-light 488 anti-Kaninchen IgG). (A-A'') Negativkontrolle einer vierfach transgenen Maus, die nicht mit Doxyzyklin behandelt wurde. Die PECs zeigen Claudin-1 immun-positiv tight junctions (Pfeil), aber keine CD44 Expression (A'' Überlagerung von Abbildung A und A'). (B-B'') Vier Tage nach Induktion der Ablation mit Doxyzyklin ist in einigen PECs zu erkennen, dass die CD44 Expression und die Claudin-1-Expression kolokalisieren (Pfeile) (B'' Überlagerung von B und B'). (C-C'') Nach neun Tagen Doxyzyklingabe sind die meisten PECs positiv für CD44 (Pfeile) (C'' Überlagerung von C und C'). (D-D'') In späteren Zeitpunkten sind die zellulären Halbmonde deutlich CD44 und Claudin-1 immun-positiv (Pfeile) (D'' Überlagerung von D und D'). Alle Balken repräsentieren 25  $\mu$ m. (C-C'' männliche Maus, alle anderen weiblich)



**Abb. 3.17: Keine Aktivierung der Podozyten.** (A-B') Immunhistochemische Doppelmarkierung für Podocin (Podozytenmarker, grün, Sekundärantikörper: Dye-light 488 anti-Kaninchen-IgG) und Desmin (Aktivierungsmarker für Podozyten, rot, Sekundärantikörper: Dye-light 549 anti-Maus-IgG). (A-A') Niere einer Maus aus der Kontrollgruppe 1. (B-B') Versuchstier 9 Tage nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung. In beiden Markierungen ist ein vergleichbares Expressionsmuster zu erkennen. Die Podozyten sind positiv für Podocin. Desmin ist hauptsächlich in den Mesangialzellen, aber auch in Endothelzellen exprimiert, nicht aber in den Podozyten (weibliche Maus). Die Balken repräsentieren 50  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend ließen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die verbliebenen Parietalzellen aktiviert wurden um sich auszubreiten und das teilweise freigelegte innere Blatt der Bowman-Kapsel wieder zu bedecken. Die Podozyten hingegen zeigten sich als nicht aktiviert.



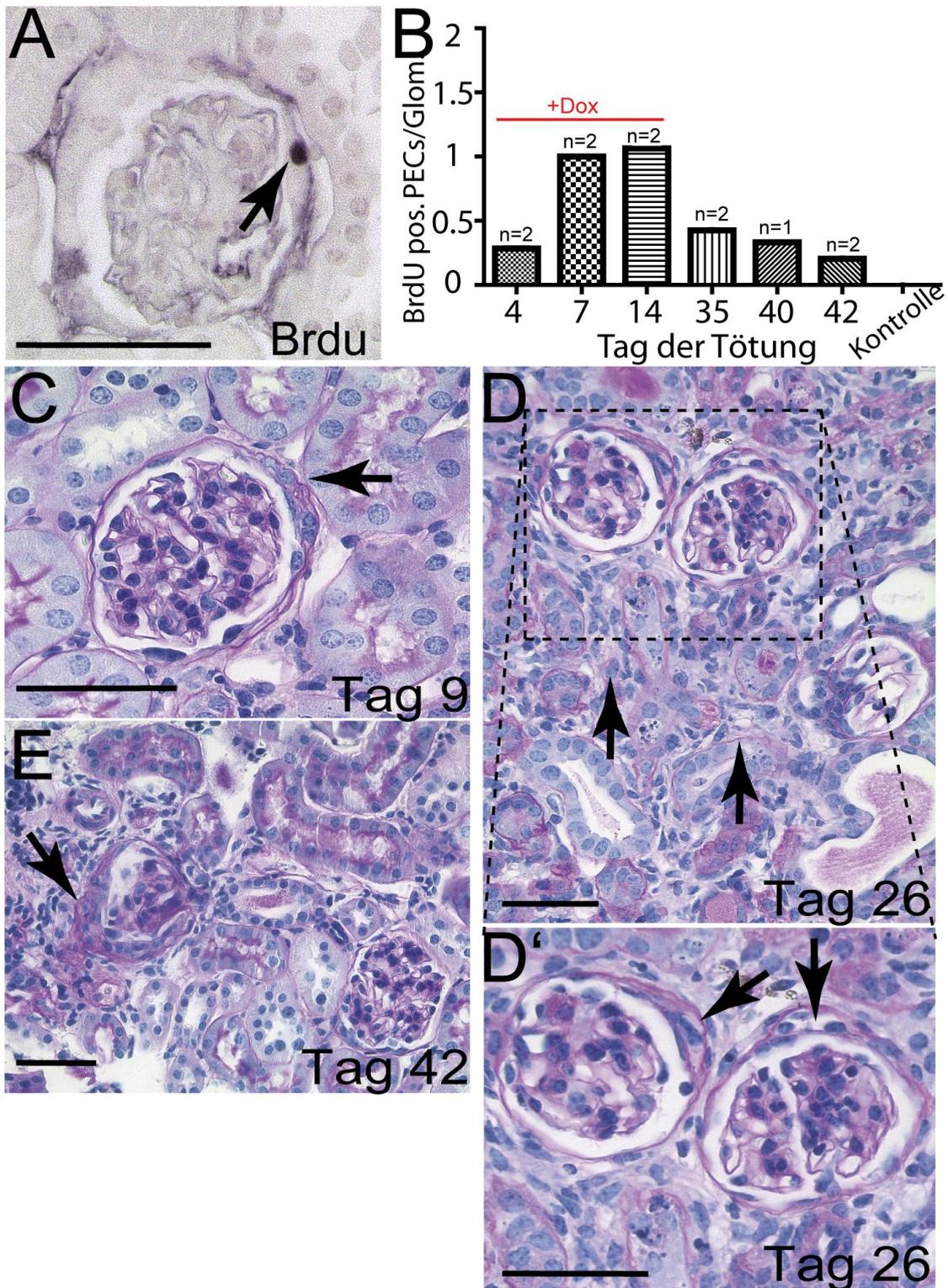
**Abb. 3.18: Transmissionselektronenmikroskopie muriner Nieren: Tag 9 der Ablation (A)** Intakte elektronendichte PECs (Pfeile), die in dünnen Fortsätzen über die mit Zellresten bedeckte Bowman-Kapsel wachsen (Asterisk). Fokal ist eine Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten zu erkennen (dünne Pfeile). Die Bowman-Kapsel scheint intakt zu sein (Pfeilspitzen), auch in Regionen, wo sie nicht mehr mit intakten PECs bedeckt ist (weiße Pfeilspitzen). (B+C) Vergößerungen von PEC-Fortsätzen (der schwarze Pfeil zeigt das Ende des Fortsatzes; die weißen Pfeilspitzen zeigen auf die „nackte“ Bowman-Kapsel). Die dünnen Pfeile zeigen auch hier auf die teilweise verschmolzenen Fußfortsätze. (D) Eine Ansammlung von PECs (P) inmitten von Zellresten. Die Pfeilspitzen zeigen die intakte Bowman-Kapsel. Ein PEC-Zellfortsatz schiebt sich von rechts über die PECs und bildet so einen mehrschichtigen Zellhalbmond (Pfeil). (männliche Mäuse, Tag 9) ( Kap. = Kapillarlumen; BR = Bowmanscher Raum; P = PEC)

### 3.4 DIE AKTIVIERTEN PARIETALZELLEN PROLIFERIEREN UND BILDEN CHARAKTERISTISCHE ZELLULÄRE HALBMONDE

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Parietalzellen tatsächlich proliferierten und so die Bildung der zellulären Halbmonde verursachten. Dazu wurde, wie vorher bereits beschrieben, den Mäusen ein Tag vor der Tötung BrdU i.p. injiziert und nachfolgend ein immunhistochemischer Nachweis von BrdU durchgeführt; die proliferativ aktiven Parietalzellen wurden quantitativ erfasst (Abb. 3.19 A). Es zeigte sich ein Anstieg der BrdU-positiven Parietalzellen an Tag 7 nach Induktion der Ablation (Abb. 3.19 B: BrdU pos. PECs/*Glomerulum*: Tag 0 (Kontrolle): 0; Tag 4: 0,3 ; Tag 7: 1). Der Höhepunkt der Proliferationsaktivität war an Tag 14 der Doxyzyklinbehandlung mit 1 BrdU pos. PECs/*Glomerulum* sichtbar. Nach Beendigung der Behandlung sank die Anzahl der BrdU-positiven Zellen zwar, blieb aber im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht bis zum letzten Zeitpunkt der Untersuchungen (Tag 35: 0,4, Tag 40: 0,3; Tag 42: 0,2). Diese nachhaltige Proliferation der Parietalzellen resultierte in der Formation von zellulären Halbmonden (d.h. mehrschichtige, extrakapillare, zelluläre Proliferate im Bowman'schen Raum). In den früheren Zeitpunkten der Proliferation (Tag 9) lagen die *Glomerula* mit meist noch zweischichtigen zellulären Halbmonden inmitten von gesunden Tubuli. In späteren Untersuchungszeitpunkten (Tag 26-40) waren die betroffenen *Glomerula* aber hauptsächlich in Regionen mit degenerierten Tubuli und fokaler interstitieller Fibrose vorzufinden (Abb. 3.19 C-E).

Deswegen lässt sich vermuten, wie vorhergehend bereits erwähnt, dass die tubulären Veränderungen aus der Bildung der zellulären Halbmonde in den *Glomerula* und der

damit verbundenen Blockade des tubulären Abflusses des Primärharns hervorgingen, somit also sekundär waren (Le Hir and Besse-Eschmann 2003). Diese fokale Entartung der Nephrone und die interstitielle Fibrose beeinträchtigten die Nierenfunktion aber nicht.



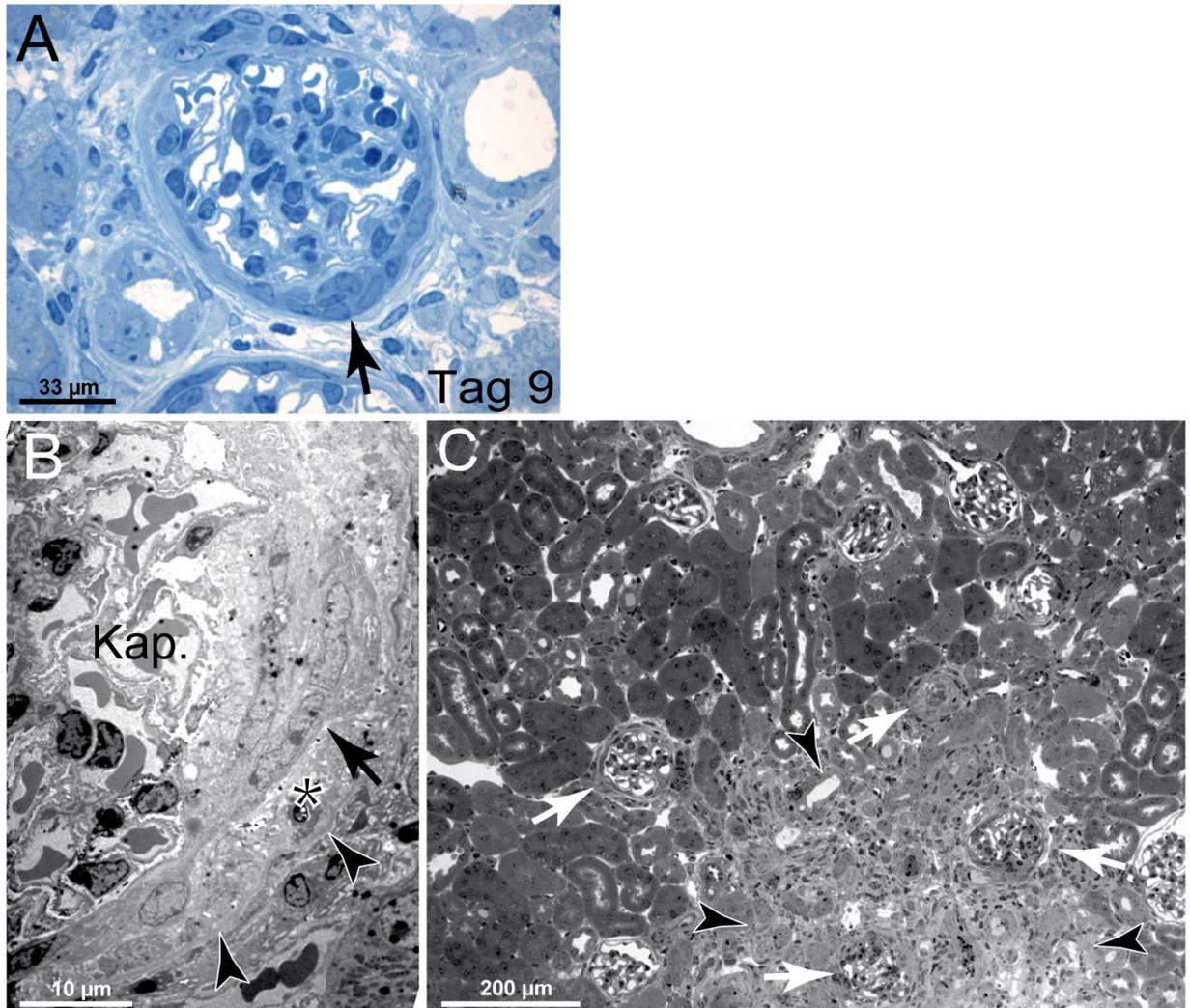
**Abb. 3.19: Proliferation verbliebener PECs führt zur Bildung zellulärer Halbmonde.** (A-B) Immunhistochemische Markierung von BrdU und die quantitative Auswertung der BrdU positiven PECs (A, Pfeil zeigt eine BrdU positive PEC). Die Proliferation der PECs steigt während der Doxyzyklinbehandlung und bleibt auch nach Beendigung dieser erhöht (20 *Glomerula*/ Gewebeschnitt/Maus). Balken= Mittelwert (C-F) PAS-Reaktion auf Paraffinschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten. (C) In frühen Zeitpunkten sind zelluläre Halbmonde in *Glomerula* zu erkennen, die keine deutliche Beschädigung des sich anschließenden Tubulus aufweisen (Pfeil). In späteren Zeitpunkten sind *Glomerula* mit zellulären Halbmonden in Regionen zu finden, die eine deutliche Tubulusdegeneration aufweisen. (D, Pfeile; D' Vergrößerung des Ausschnitts in D). Die zellulären Halbmonde zeigen die typische Morphologie mehrschichtiger extrakapillarer Proliferationen (D' und E, Pfeile). (Alle hier gezeigten Bilder stammen von weiblichen Mäusen) Falls nicht anders gekennzeichnet repräsentieren die Balken 50 µm.

Auch die weitergehende Untersuchung der Semidünnschnitte konnte die Bildung der zellulären Halbmonde bestätigen. Typische mehrschichtige zelluläre Proliferationen konnten frühestens neun Tage nach Beginn der Ablation verifiziert werden. Hier sah man diese *Glomerula* ebenfalls vorwiegend neben oder in Regionen mit degenerierten Tubuli. Die TEM-Aufnahmen bestätigten, dass diese vielschichtigen Strukturen aus Parietalzellen und deren Zellresten bestanden. Die Bowman-Kapsel zeigte sich unverletzt, ebenso die GBM (Abb. 3.20).

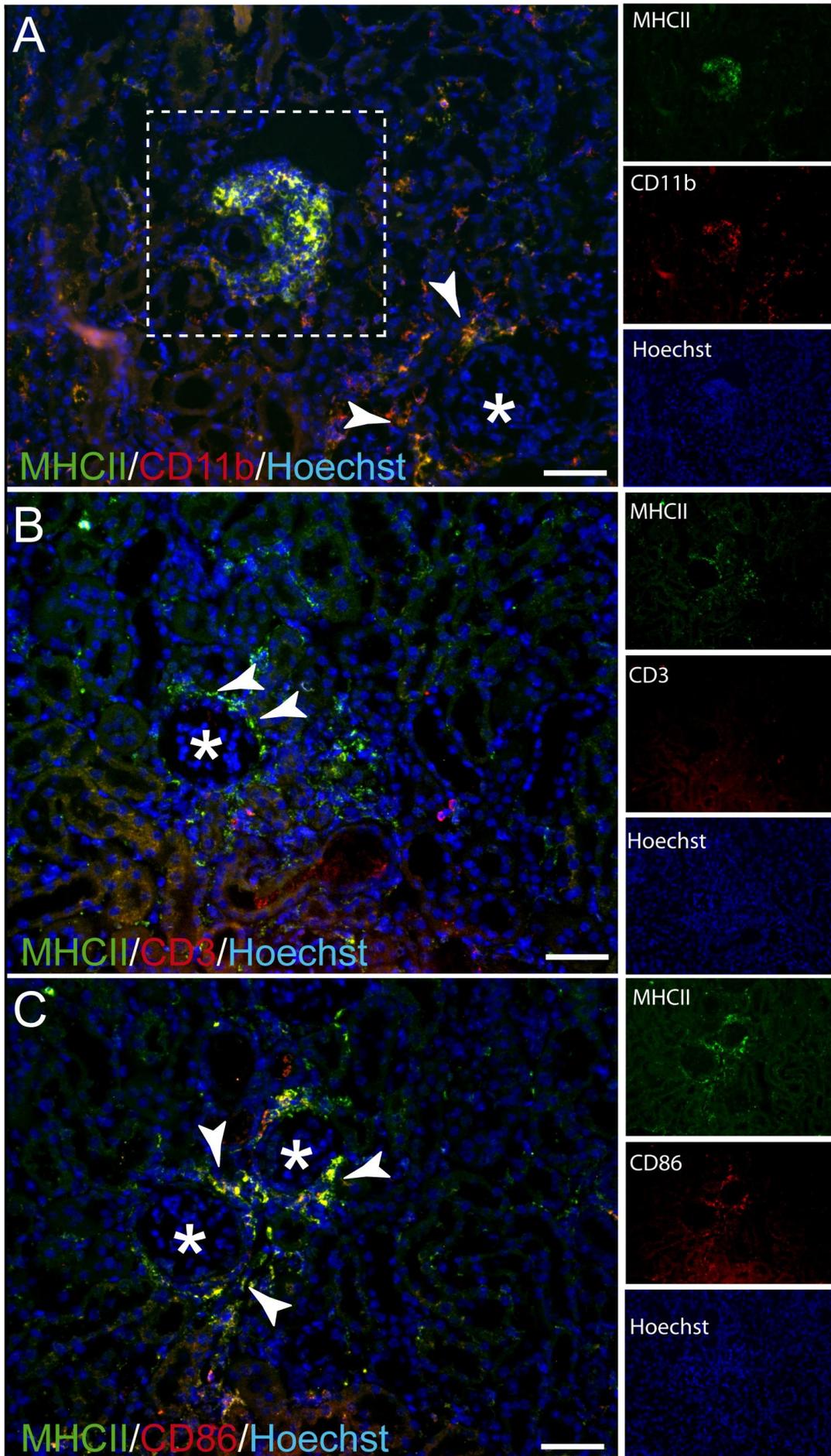
Im Weiteren wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung für die Marker typischer periglomerulärer Infiltrate durchgeführt. Es zeigte sich, dass die *Glomerula*, die extrakapillare Proliferate auf der Bowman-Kapsel aufwiesen, jene typischen Infiltrate rekrutierten (Abb. 3.21). Diese bestehen hauptsächlich aus MHCII, CD86, CD11b positiven aktivierten dendritischen Zellen und Makrophagen (Heymann et al. 2009).

Weitergehend wurde untersucht, warum die Aktivierung der Parietalzellen nach der partiellen Ablation nicht zu der Formation einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose führte. Die Adhäsionen zwischen Bowman-Kapsel und dem Kapillarknäuel wurden als der „point of no return“ für die Entstehung dieser Erkrankung beschrieben. Diese Adhäsionen gelten als „Eintrittspforte“ für die Parietalzellen, um auf das Kapillarknäuel migrieren zu können und dort Segmente zu zerstören (Smeets et al. 2011). In TEM Aufnahmen von Versuchstieren an Tag 9 und Tag 14 nach Induktion der Ablation wurde nach ebendiesen Adhäsionen gesucht. Auffallend war, dass in diesen Tieren keine Adhäsionen zwischen aktivierten

Parietalzellen auf der Bowman-Kapsel und den Podozyten auf dem Kapillarknäuel detektiert werden konnten (Abb. 3.22)

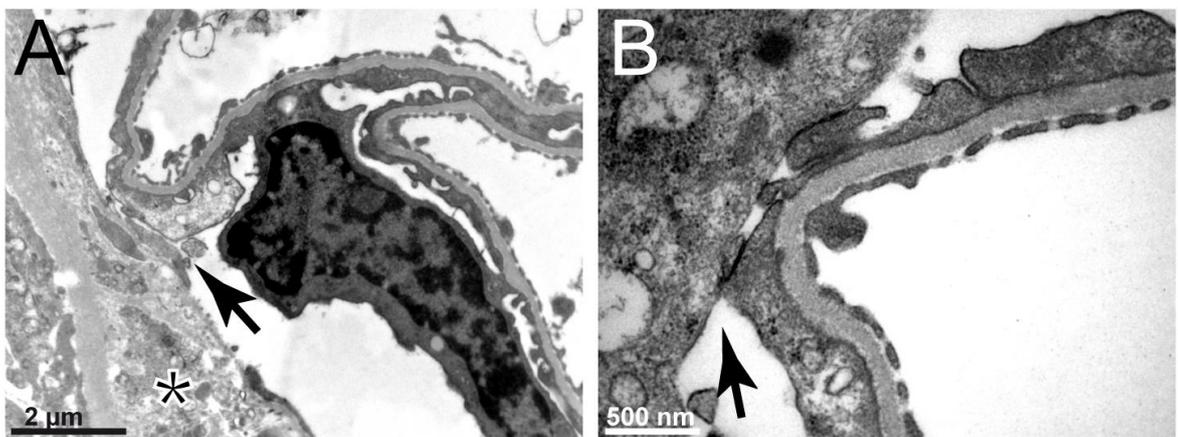


**Abb. 3.20: Analyse der Ultrastruktur der zellulären Halbmonde.** (A) Methylenblau gefärbter Semidünnschnitt (1  $\mu\text{m}$ ), der ein *Glomerulum* mit zellulärem Halbmond mit klassischer Morphologie zeigt (Pfeil). Die Kapillaren weisen keine Anzeichen von Nekrose auf (männliches Tier). (B) TEM Aufnahme eines *Glomerulum* mit zellulärem Halbmond mit mehrschichtig angeordneten PECs (Pfeil), Zellresten (Asterisk) und einer intakten Bowman-Kapsel (Pfeilspitzen). Die Kapillarschlingen zeigen sich unverändert. (C) Semidünnschnitt einer Region mit *Glomerula*, die zelluläre Halbmonde aufweisen (weiße Pfeile) und in einem Nierenabschnitt liegen, der eine deutliche Tubulusdegeneration aufweist (Pfeilspitzen) (männliche Mäuse).



**Abb. 3.21: Typische periglomeruläre Infiltrate.** (A) *Glomerulum* (Asterisk) mit extrakapillaren Proliferationen, die ein periglomeruläres Infiltrat aus MHCII-positiven und CD11b-positiven Zellen rekrutieren (Pfeilspitzen, Immunfluoreszenz Doppelfärbung, MHCII grün (Sekundärantikörper: Dye-light 488 anti-Maus-IgG), CD11b rot (Sekundärantikörper: Dye-light 549 anti-Ratte-IgG), Hoechst blau). Der Ausschnitt zeigt ein entzündliches Infiltrat, unabhängig von einem *Glomerulum*. (B+C) Außerdem zeigen sich die periglomerulären Infiltrate negativ für CD3 (B) und positiv für CD86 (C). Die Immunfluoreszenzmarkierungen wurden auf Nierengewebe von männlichen Mäusen an Tag 14 der Ablation durchgeführt. Die Bilder wurden von Prof. Christian Kurts und seinen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität, Bonn, angefertigt.

Die Balken repräsentieren 20  $\mu\text{m}$ .



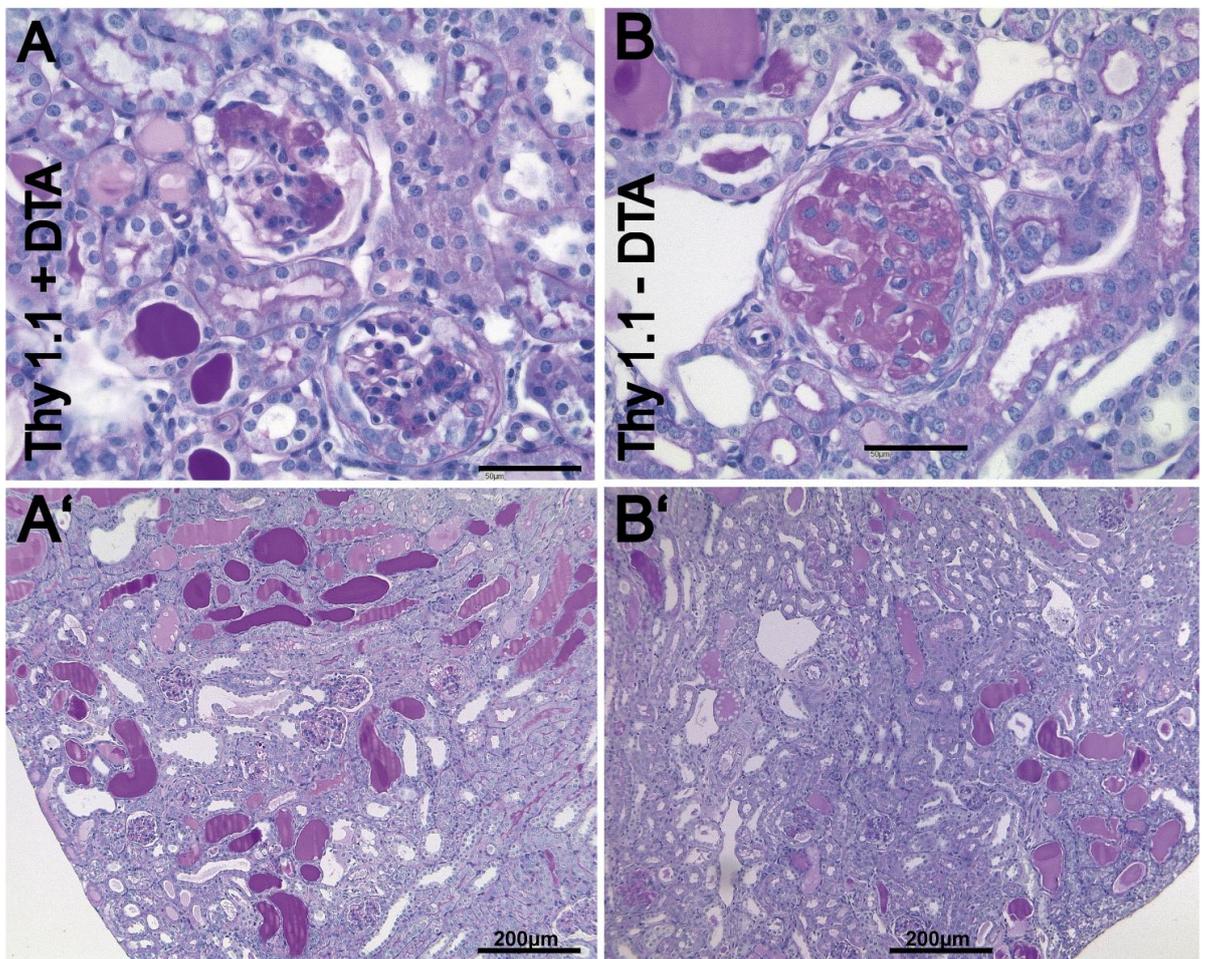
**Abb. 3.22: Keine Adhäsionen zwischen PECs und Podozyten (A+B)** TEM-Aufnahmen die zeigen, dass zwischen PECs und Podozyten keine zellulären Adhäsionen zu erkennen sind (Pfeil). (Asterisk = Zellreste)

### 3.5 PEC-ABLATION IN EINEM TIERMODELL FÜR FSGS (THY 1.1)

Um nun weiter zu untersuchen, ob Parietalzellen eine zentrale Rolle in der Entstehung der fokalen segmentalen Glomerulosklerose spielen, wurde ein weiterer Mausstamm generiert. Die vierfach transgene PEC-rtTA/LC1/ROSA26<sup>DTA176</sup>-Maus wurde mit der Thy 1.1-Maus verpaart (s. Kapitel 1.2.5). So konnten in einer Maus zunächst die Parietalzellen auferiert und danach durch Injektion des Thy 1.1-Antikörpers eine FSGS induziert werden. Da ca. 7 Tage nach Injektion des Antikörpers die Proliferation abgeschlossen und eine manifeste FSGS entstanden sein sollte, wurden die Tiere zu diesem Zeitpunkt getötet. Die Hypothese war, dass in den Tieren, die der PEC-Ablation

ausgesetzt waren, weniger FSGS als in den Kontrolltieren entstehen würde. Dies wäre ein entscheidender Hinweis auf die Bedeutung der Parietalzellen im Rahmen der FSGS.

Um zunächst den Phänotyp der so behandelten Nieren untersuchen zu können, wurde eine PAS-Reaktion auf Paraffinschnitten durchgeführt (Abb. 3.23). Zur Kontrolle wurden Geschwistertiere genommen, die negativ für das DTA waren und ebenfalls mit Doxzyklin behandelt wurden. Jedoch konnte in der PAS-Reaktion kein signifikanter Unterschied zwischen den DTA-positiven und den Kontrolltieren ausgemacht werden, so dass diese Idee nicht weiter verfolgt wurde.



**Abb. 3.23: Histologischer Vergleich von Thy 1.1 und Thy 1.1 plus DTA** PAS-Reaktion auf Nierengewebe von Thy 1.1- und DTA-transgenen Tieren (A und A') und von Kontrolltieren (Thy 1.1-positiv, aber DTA-neagtiv B und B'). Morphologisch sind keine Unterschiede im Phänotyp der beiden Mausmodelle zu erkennen. Falls nicht anders gekennzeichnet repräsentieren die Balken 50  $\mu\text{m}$ .

## 4 DISKUSSION

### 4.1 FUNKTIONALITÄT DES MODELLS

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentieren, dass mit Hilfe der PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Maus erfolgreich induzierbar Parietalzellen auferiert werden konnten. Schon in der PAS-Reaktion zeigte sich, dass es während der akuten Ablationsphase zu morphologischen Veränderungen der Parietalzellen kam (Abb. 3.2). Auch der TUNEL-Assay (Honjo et al. 1968), der normalerweise in der Niere nur wenige positive Zellen detektiert, wies auf eine Fragmentierung der DNA hauptsächlich in den Parietalzellen hin (vereinzelt waren positive Tubuluszellen zu sehen, Abb. 3.3). Gemäß Beschreibung färbt der TUNEL-Assay für die Apoptose spezifische DNA-Fragmente an. Da man in einem Modell, das über Hemmung der Translation funktioniert, weniger von einer Apoptose und eher von einer Nekrose der Zellen ausgeht, ist es wichtig zu wissen, dass der TUNEL-Assay, auch wenn oft anders benannt, jede Art von DNA-Fragmentierung markiert (Grasl-Kraupp et al. 1995). Die Nutzung des Reportergens LacZ (Appel et al. 2009; Soriano 1999), welches induzierbar  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, zeigte ebenfalls die Effizienz des Ablationssystems. Auf Grund der Tatsache, dass es auf dem gleichen Genlocus wie das DTA exprimiert wird, konnte mit Hilfe einer X-Gal-Färbung von Nieren verschieden transgener Tiere die Abnahme der blau markierten Zellen nach Doxzyklinbehandlung in vierfach transgenen Tieren deutlich gezeigt werden (Abb. 3.4). Die Analyse der Ultrastruktur der *Glomerula* lieferte den endgültigen Beweis für vorhandene Ablation der Parietalzellen (Abb. 3.5).

Mit Hilfe der immunhistochemischen Markierung für Pax-8, einem Transkriptionsfaktor der im *Glomerulum* spezifisch ist für PECs (Igarashi 2003; Ohse et al. 2009) konnte die Ablationseffizienz quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass es zu einem Verlust von ca. 30% der Gesamtanzahl an Parietalzellen kam (Abb. 3.3). Interessanterweise konnten auch die signifikanten pathologischen Veränderungen nach Induktion der Ablation nur in ungefähr 30% aller *Glomerula* detektiert werden (Abb. 3.2 G). Dafür sind verschiedene Erklärungen möglich. Zum einen ist dies die Mosaik-Expression der PEC-rtTA-Maus, die bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben wurde (Appel et al.

2009; Smeets et al. 2009a, 2011). Der Grund dafür kann die Mosaik-Expression des *rtTA-M2* sein, der im Vergleich zum Vorgänger *rtTA* zwar ein stabileres Expressionsmuster aufweist, aber eine Mosaikbildung nicht ausschließt (Urlinger et al. 2000). Außerdem ist beschrieben, dass das bakterielle TetR teilweise nicht effizient in Säugetierzellen prozessiert wird (Rossant and McMahon 1999). Daraus folgend, dass in einigen *Glomerula* vielleicht nur eine einzelne Parietalzelle das DTA exprimiert und somit auferiert wurde, ist es also möglich, dass dieser Verlust leicht durch die verbliebenen Parietalzellen wieder ausgeglichen werden konnte. Das ist wahrscheinlich, da die Parietalzellen, im Gegensatz zu den Podozyten, in der Lage sind sich selbst zu regenerieren (Pabst and Sterzel 1983). Zusätzlich ist es möglich, dass die *Glomerula*, in denen nur wenig Ablation stattfand, in unserer Analyse nicht auftraten, weil die Veränderungen nicht ausreichten, um einen glomerulären Phänotyp mit Proteinurie zu verursachen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Ablation einzelner Parietalzellen in einem *Glomerulum* die transkriptionelle Aktivität des Promotors in den Nachbarzellen antrieb und es so zu einer Zunahme der Ablation eben nur in betroffenen *Glomerula* kam. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass auf Grund der Verwendung von ausschließlich DTA-heterozygoten Mäusen die Effizienz der Ablation niedrig war. Da das LacZ auf dem gleichen ubiquitären ROSA26-Locus liegt, konnten die vierfach transgenen Tiere für diese beiden Transgene lediglich heterozygot sein.

Der aus Teilen des humanen und des Kaninchen-spezifischen Podocalyxin-Gens zusammengesetzte PEC-Promotor (*pPEC cPodxl1*) wurde beschrieben als spezifisch aktiv in Parietalzellen (Appel et al. 2009). Das endogene *PODXL1*-Gen ist hingegen vor allem in Podozyten lokalisiert (Appel et al. 2009; Kershaw et al. 1995; Urlinger et al. 2000). Um die Möglichkeit der ektopischen Aktivität des PEC-Promotors in anderen glomerulären Zellen auszuschließen, die auch auf Grund der Herkunft des PEC-Promotors fraglich war, wurde ein weiteres Reporter gen verwendet. Mit Hilfe des sehr sensitiven, akkumulierenden Histon-eGFP-Reporter gens (Tumbar et al. 2008) konnte ausgeschlossen werden, dass der Promotor eine ektopische Aktivität im *Glomerulum* aufweist (Abb. 3.14). So konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass die Podozyten nicht von der Ablation betroffen sind. Nichtsdestotrotz konnte eine leichte, nicht signifikante Abnahme der absoluten Podozytenzahl während der ersten 4 Tage

der Doxyzyklinbehandlung festgestellt werden (Abb. 3.14). Es ist wahrscheinlich, dass diese Abnahme eine Konsequenz der Ablation der sog. transitorischen Zellen darstellt. Diese Zellen sind entlang der efferenten Arteriole der *Glomerula*, am Übergang zwischen Parietalzellen und den voll differenzierten Podozyten lokalisiert (Appel et al. 2009). Diese transitorischen Zellen exprimieren gleichzeitig sowohl Parietalzell- als auch Podozyten-Markerproteine (z.B. WT1) (Gibson et al. 1992). Die hier verwendete PEC-rtTA-Mauslinie exprimiert das LacZ und somit auch das DTA ebenfalls in diesen Zellen.

Wie vorher bereits vermutet, und durch die Reporteragen-Färbungen bestätigt wurde, fand zwar im *Glomerulum* die Ablation spezifisch in Parietalzellen statt, in der gesamten Niere kam es jedoch auch zur Ablation von Zellen des Tubulusepithels (Appel et al. 2009). Die Verteilung dieser Ablation auf die verschiedenen Tubulusabschnitte stellte sich ebenfalls wie vermutet dar (Abb. 1.5 B). So zeigte sich durch die differentielle Immunmarkierung spezifischer Tubulusmarker, dass vor allem der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife betroffen war (Abb. 3.11) (Gokhale et al. 1996). Die Ablation vor allem in diesem Abschnitt des Tubulussystems, stellt eine mögliche Erklärung für die qualitative Zunahme der Trinkmenge der Tiere in der akuten Ablationsphase dar. Dadurch könnte ein Problem der Rückresorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  entstanden sein (Burg and Green 1973; Knepper et al. 1999; Rocha et al. 1999). Um diese, bereits vorher vermuteten, Verluste auszugleichen, wurde dem Trinkwasser der Versuchstiere 50% Ringerlösung zugesetzt. Die Veränderungen, die durch die Ablation im Tubulussystem auftraten, erwiesen sich als vollständig reversibel. Zum einen zeigte sich dies durch die Abnahme der Polydipsie bereits an Tag 7 nach Beginn der Ablation, also nach dem Ende der akuten Ablation. Zum anderen zeigten sowohl PAS-Aufnahmen als auch die Analysen der Ultrastruktur zu späten Zeitpunkten eine nahezu normale Tubulussmorphologie. Die Papille zeigte sich wieder völlig intakt (Abb. 3.10). Lediglich in den Abschnitten mit veränderten *Glomerula* ließen sich in späten Zeitpunkten fibrotische Areale ausmachen (Abb. 3.19 und 3.20). Das erneute Entstehen dieser nahezu „gesunden Morphologie“ wurde durch die Auswertung der Immunhistochemie gegen BrdU erklärt (Pera et al. 1977). Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg proliferierender Tubuluszellen zwischen Tag 7 und Tag 14. Die Anzahl der

BrdU-positiven Zellen erreichte nach Beendigung der Doxyzyklinbehandlung wieder basale Werte als Antwort auf die erfolgreiche Reparatur (Abb. 3.12).

Da die Mäuse während der gesamten Ablationsphase lebensfähig waren, ist eine Aktivität des Promotors außerhalb der Niere unwahrscheinlich. Diese Erkenntnis stimmt mit der vorhergehenden Charakterisierung der PEC-rtTA/LC1-Mauslinie überein (Appel et al. 2009).

Somit wird in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Modell vorgestellt, dass induzierbar spezifisch Parietalzellen auferiert. Diese Ergebnisse zeichnen den PEC-Promotor als sehr wertvolles Werkzeug aus, da bis jetzt kein anderes endogenes Genprodukt gefunden wurde, das mit vergleichbarer Spezifität auf Parietalzellen abzielt.

## 4.2 ABLATION UND PROTEINURIE

Interessant ist, dass die akute Ablation der Parietalzellen mit einer Albuminurie korrelierte (Abb. 3.6). Für die Entstehung dieser Albuminurie gibt es zwei mögliche Gründe: Zum einen ist eine Veränderung im Tubulussystem, die z.B. die Albumin-Reabsorptionsfähigkeit der Tubuluszellen aufhebt, möglich; zum anderen könnte ein teilweiser Verlust der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere ursächlich für die Albuminurie sein.

Um die erste Möglichkeit auszuschließen, wurde eine Immunhistochemie spezifisch für Megalin durchgeführt. Megalin ist ein Rezeptorprotein, das zusammen mit Cubilin u.a. für die Endozytose von Albumin im Tubulussystem zuständig ist. Der gemeinsame Knockout im Tiermodell führt zu einer Albuminurie (Christensen and Birn 2001; Weyer et al. 2011). Da das Megalin-Markierungsmuster der für diese Arbeit verwendeten Doxyzyklin behandelten vierfach transgenen Versuchstiere aber mit dem der Kontrolltiere identisch war (Abb. 3.7), konnte ein Defekt der Albumin-Reabsorptionsfähigkeit der Tubuluszellen ausgeschlossen werden. In einer jüngeren Studie wurden spezifisch Tubuluszellen mit Hilfe des DT-Rezeptors depletiert und auch dies führte zu einer Albuminurie (Grgic et al. 2012). Somit ließe sich behaupten, dass die geringgradige Ablation des Tubulusepithels auch in dem Parietalzellablationsmodell ursächlich für die Albuminurie ist. Allerdings wurde in der Arbeit von Grgic et al. eine Korrelation von Albuminurie und durch den Tubulusverlust

verursachter Glomerulosklerose festgestellt. So ist es wahrscheinlicher, dass diese sekundäre Glomerulosklerose für die Albuminurie verantwortlich war. Eine solche Sklerose war in dem hier vorgestellten Ablationsmodell zu keinem Zeitpunkt sichtbar. Außerdem konnte immunhistologisch und über eine Urin-Gelelektrophorese gezeigt werden, dass die Albuminurie vom *Glomerulum* und nicht vom Tubulus ausging. Es handelte sich um eine selektive Proteinurie, d.h. sie besteht hauptsächlich aus Albumin, was ein charakteristisches Merkmal für einen geringen Verlust der Selektivität ist (Abb. 3.6 und 3.7).

Der Hauptgrund für das Auftreten einer solchen selektiven transienten Proteinurie ist die pathologische Veränderung der Podozyten, wie z.B. die Verschmelzung der Fußfortsätze. In dem Thy 1.1-Mausmodell kam es bereits 24 Std nach Injektion des Antikörpers zu einer Verschmelzung der Fußfortsätze und korrespondierend zu einer deutlichen Albuminurie (Smeets et al. 2003). In den Tiermodellen, in denen Podozyten auferiert wurden, führte ein Verlust von ca. 40% zu einer Proteinurie (Macary et al. 2010; Matsusaka et al. 2005; Wharram et al. 2005). Somit galt die Aufmerksamkeit zur Klärung dieser Frage im Weiteren den Podozyten. Wie bereits erwähnt, kam es zu keiner Ablation dieser Zellen durch ektopische Aktivität des PEC-Promotors. Um die Morphologie der Podozyten in den Versuchstieren mit Albuminurie beurteilen zu können, wurden die TEM-Aufnahmen im Hinblick auf die Verschmelzung der Fußfortsätze untersucht. Tatsächlich konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren ein Verlust von ca. 30% der Fußfortsätze festgestellt werden (Abb. 3.8 A). Interessant war, dass diese Verschmelzung der Fußfortsätze immer in unmittelbarer Nachbarschaft zu zerstörten Parietalzellen zu sehen war (Abb. 3.8). Da nur die A-Kette des Diphtherietoxins in den Parietalzellen exprimiert wird und Nagetiere natürlicherweise keinen Rezeptor für selbiges haben, ist es nicht möglich, dass das Toxin ursächlich für die pathologischen Veränderungen der Podozyten war (Collier 2001; Maxwell et al. 1987; Mitamura et al. 1995).

Sobald die Doxyzyklinbehandlung und somit die Ablation der Parietalzellen beendet wurde, verschwand auch die Proteinurie, d.h. sie war vollständig reversibel. Das suggeriert, dass die von der Ablation betroffenen Parietalzellen Signale generieren, die in einer Verletzung der Integrität des glomerulären Filters resultierten. So ist es wahrscheinlich, dass ein sog. „danger signal“ von den sterbenden Parietalzellen

übermittelt wird. Das könnte durch zelluläre Komponenten wie Nukleinsäuren, ATP, Harnsäure etc. passieren. Diese Komponenten binden und aktivieren spezifische Rezeptoren, von denen bekannt ist, dass sie auf Podozyten exprimiert werden, wie z.B. Toll like Rezeptor 2 oder das sog. Inflammasom (Anders and Muruve 2011). Die Aktivierung und die Proliferation der Parietalzellen persistierten auch nach der Induktion der Ablation und korrelierten somit nicht mit dem Auftreten der Proteinurie. Das spricht gegen ein spezifisches Signal für die Filtrationsbarriere ausgehend von den aktivierten Parietalzellen.

Um zuletzt eine tubuläre Obstruktion als möglichen Grund für die pathologischen Veränderungen in den *Glomerula* auszuschließen, wurde den vierfach transgenen Versuchstieren und Thy 1.1-Mäusen einen Tag nach Injektion des Thy 1.1-Antikörpers Gold-markiertes BSA injiziert. Die Thy 1.1-Mäuse dienten dabei als Positivkontrolle, da in diesem Modell Proteinzyylinder den tubulären Abfluss verhindern. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten, dass in dem hier vorgestellten Tiermodell zu keinem Zeitpunkt der akuten Ablation eine Obstruktion vorlag (Abb. 3.13)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es wahrscheinlich ist, dass die „sterbende“ Parietalzelle Signale an den gegenüberliegenden Podozyten sendet und somit die Verschmelzung der Fußfortsätze verursacht, die zu der Entstehung der selektiven Proteinurie führt. Die Klärung der Kommunikation zwischen Parietalzelle und Podozyt ist Gegenstand der weiteren Forschung.

Wie vorhergehend bereits mehrfach erwähnt, ist sehr interessant, dass die glomeruläre Filtrationsbarriere durch selektive Ablation der parietalen Epithelzellen in ihrer Integrität gestört wird, da die Parietalzelle kein direkter Bestandteil der Filtrationsbarriere ist. Somit ist diese Arbeit die erste, in der eine spezifische Ablation einer Zellpopulation außerhalb der Filtrationsbarriere die Integrität dieser Barriere beeinträchtigt.

### 4.3 AKTIVIERUNG DER PARIETALZELLEN

Ein weiterer interessanter Befund war, dass die partielle Ablation einzelner Parietalzellen in einer Aktivierung der verbliebenen Parietalzellen resultierte. Diese Aktivierung wurde durch die *de novo* Expression des Aktivierungsmarkers CD44

deutlich (Abb. 3.15 und 3.16) (Ohse et al. 2009; Smeets et al. 2006; 2009a). Außerdem zeigte die quantitative Auswertung der BrdU-Immunhistochemie eine proliferative Aktivität der verbliebenen Parietalzellen vor allem an Tag 14, also dem Ende der akuten Ablation (Abb. 3. 19 A und B). Die Untersuchung der Ultrastruktur bestätigte diese Aktivität. So ließen sich in TEM-Aufnahmen Parietalzellen finden, die Zellfortsätze bildeten und sich über Zellreste oder eine leere Bowman-Kapsel legten (Abb. 3.18). Diese beiden Eigenschaften der verbliebenen Parietalzellen ließen sich ebenfalls in den Parietalzellen feststellen, die an der Bildung der Läsionen in an FSGS oder RPGN erkrankten *Glomerula* beteiligt sind (Dijkman et al. 2005; Smeets, et al. 2009 a, 2009 b, 2011).

Da, wie bereits beschrieben, das transgene System, das für die Ablation der Zellen mit einer abgeschwächten Mutation der A-Kette des DT sorgte, höchst spezifisch ist, kann auch hier ausgeschlossen werden, dass nach der Lyse der betroffenen Parietalzellen andere Parietalzellen durch das Toxin aktiviert und zur Proliferation stimuliert wurden (Maxwell et al. 1987; Mitamura et al. 1995; Wu et al. 2006). Weil außerdem durch die irreversible Aktivierung der Cre-Rekombinase nach Doxzyklingabe die Expression des Transgens und somit die Ablation der Parietalzellen, in einem „ja oder nein“-Muster passierte, kann die Aktivierung der verbliebenen Parietalzellen keine direkte Folge einer geringen Aktivität des transgenen Zellablationssystems in diesen Zellen sein.

Im Weiteren wurden auch die Podozyten im Hinblick auf Ihre mögliche Aktivierung untersucht. Dabei zeigte eine Immunfluoreszenz spezifisch für Desmin, einem Aktivierungs- und Dedifferenzierungsmarker für Podozyten, in den Versuchstieren das gleiche Färbemuster wie in den Kontrolltieren. So wiesen die Podozyten zwar lokal eine Verschmelzung ihrer Fußfortsätze auf, waren aber nicht insoweit beeinträchtigt, dass eine Desmin-Expression vorlag (Abb 3. 17) (Zou et al. 2006).

Ganz abgesehen von den oben beschriebenen Mechanismen ist die Aktivierung der Parietalzellen möglicherweise eine physiologische Reaktion, um die akute Verletzung der *Glomerula* zu regenerieren. In vorhergehenden Arbeiten wurde beschrieben, dass Parietalzellen nicht nur sich selbst durch Zellproliferationen regenerieren können (Pabst and Sterzel 1983), sondern auch Tubuluszellen (Lazzeri et al. 2007) und Podozyten (Appel et al. 2009; Ronconi et al. 2009). Wie bereits erläutert, wurde in dieser Studie gezeigt, dass die verbliebenen Parietalzellen Zellverlängerungen bildeten,

um die Zellreste der auferierten Parietalzellen und/oder die freigelegte Bowman-Kapsel zu bedecken. Das weist darauf hin, dass die hier gezeigte Aktivierung der Parietalzellen tatsächlich Teil des normalen regenerativen Prozesses ist, um Verletzungen zu reparieren, die durch die Parietalzellen selbst verursacht wurden.

#### 4.4 BILDUNG EINER TYPISCHEN HALBMONDNEPHRITIS

Ein weiterer wichtiger Befund der vorliegenden Arbeit war, dass die partielle Ablation der Parietalzellen zu einer Bildung von zellulären Halbmonden führte, die typisch sind für die zellulären Veränderungen im Rahmen der RPGN. Per Definition bestehen diese Halbmonde aus einem mindestens zweischichtigen extrakapillaren Proliferat im Bowman'schen Raum (Singh et al. 2011). Die Bildung der Halbmonde in dem hier untersuchten Ablationsmodell begann zum Ende der Doxyzyklinbehandlung (Tag 9) mit zweischichtigen Halbmonden, die sich, mit zunehmendem Zeitpunkt der Tötung, in immer mehr Zellschichten darstellte. Die zellulären Proliferate ließen sich sowohl in der PAS-Reaktion als auch in Semidünnschnitten und TEM-Aufnahmen zeigen. (Abb. 3.19 und 3.2).

Dabei sind die zellulären Halbmonde in dem vorliegenden Modell nicht das Resultat eines akuten inflammatorischen Prozesses, sondern scheinen vielmehr das Ergebnis einer überschießenden Proliferation der Parietalzellen zu sein. Solche zellulären Halbmonde ohne immunologische Pathogenese wurden vorhergehend in Mausmodellen entdeckt, die eine Podozyten-spezifische Inaktivierung von Vhlh (Von Hippel–Lindau-Gen) (Ding et al. 2006) oder eine ebenfalls Podozyten-spezifische Überexpression von PDGF-D („platelet derived growth factor“) (van Roeyen et al. 2011) zeigten. Auffallend war im Vergleich zu diesen Studien, dass in dem hier genutzten Modell kein deutlicher Podozyten-Phänotyp vorlag. Neben der fokalen Fußfortsatzverschmelzung konnte keine Aktivierung der Podozyten detektiert werden. Auch die Proliferate bestanden ausschließlich aus aktivierten Parietalzellen und nicht, wie beschrieben, zusätzlich aus Podozyten. Das könnte darauf hinweisen, dass bestimmte Podozytopathien oder der Verlust von Podozyten zwar ein möglicher Auslöser für die Entstehung dieser *Glomerulonephritis* waren, aber die Parietalzelle den entscheidenden Faktor in der Pathogenese der RPGN darstellte.

In vorhergehenden Arbeiten wurden die Komponenten des periglomerulären Infiltrats bei der Halbmondnephritis näher untersucht (Heymann et al. 2009). Es zeigte sich, dass es sich in der hier vorliegenden Arbeit um Infiltrate handelte, die typisch sind für zelluläre Halbmonde. Diese Infiltrate bestehen hauptsächlich aus aktivierten dendritischen Zellen (Abb. 3.21) (Fujinaka et al. 2007.; Heymann et al. 2009). Daraus lässt sich schließen, dass durch die partielle Ablation der Parietalzellen und der daraus resultierenden Aktivierung und Proliferation der verbleibenden Parietalzellen klassische zelluläre Halbmonde entstehen können.

Zu den späten Zeitpunkten nach induzierter Ablation konnten in den Nieren der Versuchstiere Bereiche mit interstitieller Fibrose festgestellt werden, obwohl zu frühen Zeitpunkten der Ablation keine Anzeichen für eine Unterbrechung zwischen *Glomerulum* und anschließendem Tubulus zu erkennen waren (keine Hinweise auf eine Obstruktion). In diesen Arealen fanden sich immer die *Glomerula* mit Halbmondbildung, so dass der hier vorliegende Phänotyp des Tubulussystems nicht als direkte Folge einer Tubulusnekrose interpretiert, sondern als sekundäre Degeneration, ausgelöst durch die Bildung zellulärer Halbmonde, gesehen werden muss (Abb 3.19 und 3.20).

Wie in kürzlich veröffentlichten Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt, kann die Aktivierung der Parietalzellen in zwei verschiedenen Pathologien münden: FSGS oder die Formation der zellulären Halbmonde (d.h. RPGN) (Smeets et al. 2009a, 2011).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass in der vorliegenden Arbeit nicht ein einziger Hinweis auf zelluläre Adhäsionen zwischen Kapillarknäuel und den Halbmondformationen (extrakapillare Proliferationen) gefunden werden konnte (Abb. 3.22). Diese Entdeckung unterstützt die Hypothese, dass diese zellulären Halbmonde ohne die Beteiligung von aktivierten Podozyten entstehen können und erklärt außerdem das Nicht-Auftreten einer FSGS, trotz aktivierter Parietalzellen.

Mit diesem Modell ist ein weiteres Argument für die Parietalzelle als möglicherweise wichtigstem Mediator für die Entstehung der RPGN in der kontroversen Diskussion gefunden (Singh et al. 2011).

#### 4.5 PARIETALZELLABLATION UND FSGS

Wie unter dem vorherigen Punkt bereits kurz ausgeführt, ist es bemerkenswert, dass es in diesem Modell für die Ablation der Parietalzellen zwar zu einer Aktivierung der verbliebenen Parietalzellen, aber nicht zu der Bildung einer FSGS kam. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die zellulären Adhäsionen zwischen Bowman-Kapsel und dem glomerulären Kapillarknäuel fehlen, die eine Voraussetzung für die Bildung der Läsionen sind. In der Entstehung der FSGS ist die Bildung dieser Adhäsion der „crucial point of no return“ (Kriz et al. 1994). Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, dass eine zusätzliche Verletzung der Podozyten, wie z.B. durch deren Verlust und/oder eine teilweise unbedeckte GBM, nötig ist für die Bildung dieser Adhäsionen und daher auch essentiell für die Entstehung einer FSGS (Elger and Kriz 1998; Matsusaka et al. 2005; Wharram et al. 2005).

Somit wäre es notwendig, vorherige Studien zur transgenen Ablation von Podozyten ein weiteres Mal zu untersuchen (Macary et al. 2010; Matsusaka et al. 2005; Wharram et al. 2005). In diesen Studien schritt der Verlust von Podozyten über die Zeit fort, auch nachdem die transgene Depletion gestoppt wurde. Dies führte direkt zur Bildung klassischer, sklerotischer Läsionen (FSGS). Die Hypothese ist nun, dass nicht allein die Podozyten für die Entstehung der Sklerose verantwortlich waren, sondern die Parietalzellen durch die Ablation der Podozyten aktiviert werden. Diese aktivierten Parietalzellen infiltrieren das Kapillarknäuel über eine Adhäsion, in der sie Matrix platzieren und die verbliebenen Podozyten verdrängen (Ichikawa et al. 2005). Smeets et al. haben kürzlich den Pathomechanismus der FSGS weitestgehend aufklären können (Smeets et al. 2011).

Die Frage, ob eine FSGS ohne Parietalzellen entstehen kann, konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend beantwortet werden. Die Verpaarung der vierfach transgenen PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup>-Maus mit der Thy 1.1-Maus als FSGS-Modell konnte keinen Hinweis darauf geben. So konnten nach Injektion des Thy 1.1-Antikörpers in Tiere nach der Induktion der Ablation, sowie Kontrolltiere, die nicht transgen für DTA waren und daher keine Parietalzellen auferierten, keine Unterschiede hinsichtlich der Läsionen der *Glomerula* gezeigt werden (Abb. 3.23). Das bedeutet aber nicht, dass die

Parietalzelle nicht essentiell für die Entstehung der FSGS ist, sondern lediglich dass es schwierig ist, zwei fokale Modelle miteinander zu kombinieren.

Wie bereits erläutert, kam es in dem in dieser Arbeit charakterisierten Mausmodell lediglich zu einer partiellen Ablation der Parietalzellen. Daraus ergab sich ein glomerulärer Phänotyp in 30% der *Glomerula*. In der Thy 1.1-Maus sind ebenfalls nur ca. 30% der *Glomerula* von der Sklerose betroffen (Kollias et al. 1987; Smeets et al. 2003). Somit war die Wahrscheinlichkeit sehr klein, dass beide Pathologien in einem *Glomerulum* auftreten. Da es sich bei der FSGS generell um eine Erkrankung mit fokaler Verteilung handelt, ist es wahrscheinlich ebenso schwierig, mit einer Kombination des Parietalzellablationsmodells und anderen FSGS-Modellen, wie z.B der 5/6-Nephrektomie oder des Doca-Salz Modells (Smeets et al. 2011), einen Effekt der Ablation auf die Entstehung der FSGS auszumachen.

Nichtsdestotrotz lässt sich zusammenfassend sagen, dass es sich bei dem für dieses Mausmodell verwendeten PEC-Promotor um ein wertvolles und bisher für die Parietalzellen einzigartiges Werkzeug handelt. Das hier charakterisierte Mausmodell ist somit das erste, das spezifisch Parietalzellen auferiert.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Akute glomeruläre Schädigungen gehen häufig mit einer pathologischen Proliferation von Zellen innerhalb der glomerulären Kapsel einher, die schließlich in der Entstehung einer Niereninsuffizienz mündet. Vor allem bei der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und der rasch progressiven *Glomerulonephritis* (RPGN) stellen diese pathologischen Proliferationen einen pathognomonischen Befund dar. Viele wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre versuchten, die Frage nach dem entsprechenden Auslöser für die Entstehung dieser Erkrankungen zu beantworten. So standen neben den Mesangialzellen auch die viszerale Epithelzellen des *Glomerulum*, die Podozyten, im Fokus der Forschung. In jüngeren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proliferate vor allem aus parietalen Epithelzellen (PECs) bestehen. In der vorliegenden Studie wurde durch Kreuzung von PEC-rtTA/LC1-Mäusen mit ROSA<sup>DTA176</sup> Mäusen erstmalig ein Mausmodell generiert, das Doxyzyklin-induzierbar ein attenuiertes Diphtherietoxin (DTA176) spezifisch in PECs exprimiert und so deren Zelltod herbeiführt. Zunächst sollte die Auswirkung des PEC Verlustes auf das *Glomerulum* untersucht werden, um nachfolgend die Rolle der PECs in der Entstehung der proliferativen Erkrankungen zu klären.

Zur Induktion der Ablation wurde den Versuchstieren für maximal 14 Tage 2 mg/ml Doxyzyklin über das Trinkwasser verabreicht. Histologische Untersuchungen der Nieren von vierfach transgenen Versuchstieren erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten der Doxyzyklinbehandlung. Nicht behandelte Tiere (Kontrollgruppe 1) und behandelte, DTA-Wildtyp Mäuse (Kontrollgruppe 2) dienten zum Vergleich. Schon in der PAS-Reaktion ließen sich besonders an Tag 9 nach Beginn der Ablation deutliche morphologische Veränderungen, wie Protein im Bowman'schen Raum und nicht abgrenzbare PECs in ca. 30% der *Glomerula* erkennen. Der TUNEL-Assay, der DNA-Fragmente markiert wie sie typischerweise im Rahmen des Zelluntergangs bei Behandlung von Zellen mit DTA entstehen, zeigte zu jedem Zeitpunkt der Doxyzyklinbehandlung positive PECs in einer Subpopulation der *Glomerula*. Zur genauen Quantifizierung des PEC-Verlustes wurde eine immunhistochemische Markierung für den Transkriptionsfaktor PAX-8 durchgeführt. Die Auswertung zeigte

einen Verlust von ca. 30% der Pax-8 positiven PECs an Tag 9 der Doxyzyklinbehandlung. Da nur 30% der *Glomerula* von der Ablation betroffen waren, konnte von 50-90% PEC-Ablation/*Glomerulum* ausgegangen werden. Nach Beendigung der Behandlung mit Doxyzyklin nahm die Zahl der PAX-8 positiven PECs pro *Glomerulum* wieder zu. Die X-Gal Färbung, welche die Aktivität der ebenfalls unter dem ROSA-Promotor exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase blau darstellt, gab einen weiteren Hinweis auf eine deutliche Abnahme der PECs in den behandelten, vierfach transgenen Versuchstieren. Schließlich zeigte auch die Analyse der Ultrastruktur (Methylenblaugefärbte Semidünnschnitte und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) Aufnahmen) die erfolgreiche, zumindest partielle Ablation der PECs in dem hier verwendeten Tiermodell.

Untersuchungen der Sammelurinproben von Mäusen beider Kontrollgruppen und solchen von vierfach transgenen Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Doxyzyklinbehandlung, zeigten eine deutliche, progressive und selektive Albuminurie während der akuten PEC-Ablationsphase. Auch der immunhistochemische Nachweis von Albumin und Megalin in den Nieren der Versuchstiere bestätigte die Ergebnisse der Urinalysen, vor allem im Hinblick auf die Selektivität der Albuminurie. Nach Abbruch der Doxyzyklinbehandlung stellte sich diese Albuminurie als vollständig reversibel dar, was die Vermutung bestätigte, dass ein Zusammenhang zwischen der partiellen Ablation der PECs und der Albuminurie bestand. Da die PECs kein direkter Bestandteil der Filtrationsbarriere sind, stellte sich im Weiteren die Frage nach der Ursache für die Albuminurie. Der häufigste Grund für das Auftreten einer selektiven Proteinurie stellt die fokale Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten dar. Diese konnte in TEM-Aufnahmen von Nieren vierfach transgener Mäuse an Tag 9 der Induktion der Ablation bei ca. 30% der Podozyten detektiert werden. Die Verschmelzungen lagen interessanterweise ausschließlich in der Nähe von ebenfalls veränderten PECs. Eine akute Obstruktion des proximalen Tubulus als weitere mögliche Ursache für die Veränderungen der Filtrationsbarriere und die Albuminurie konnte u.a. durch die Untersuchung von Nieren von Mäusen nach Injektion eines Goldmarkierten BSA ausgeschlossen werden.

Da bereits von der PEC-rtTA/LC1-Mäusen bekannt war, dass der Promotor auch in Teilen des Tubulussystems aktiv ist, wurde mit Hilfe von spezifischen

immunhistochemischen Markierungen untersucht, welche Tubulusabschnitte in welcher Weise von der Ablation betroffen waren. Es zeigte sich, dass wie erwartet nur eine geringe morphologische Veränderung im tubulären System zu detektieren war, und hauptsächlich der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife betroffen war (Immunfluoreszenzmarkierung für Tamm horsfall Protein (THP)).

Auch die Anzahl an Zellen, die für den Podozytenmarker WT-1 (Wilms-Tumor Protein, Transkriptionsfaktor) positiv markiert waren, nahm während der Behandlung mit Doxyzyklin leicht ab. Deshalb sollte mit Hilfe eines weiteren Transgens die ektopische Aktivität des Promotors ausgeschlossen werden. Dazu wurde das hier untersuchte PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup> – Mausmodell mit einer tetO<sub>7</sub>-HIST1H2BJ/GFP Maus verpaart. In den Nierengewebe dieser fünfach transgenen Mäuse ließ sich weder vor, noch nach Doxyzyklinbehandlung eGFP in Podozyten oder anderen Zellen des *Glomerulum* nachweisen. Somit kam es in unserem Mausmodell zu keiner ektopischen Aktivität des PEC-rtTA-Transgens in Podozyten, und die Abnahme der WT-1 positiven Zellen ließ sich mit der Ablation sog. transitorischer Zellen erklären.

Aufgrund der partiellen Ablation wurde im Weiteren das Verhalten der verbliebenen PECs untersucht. Ab Tag 4 nach Beginn der Doxyzyklinbehandlung exprimierten die PECs *de novo* den für sie spezifischen Aktivierungsmarker CD44. In späteren Zeitpunkten proliferierten die verbliebenen PECs und bildeten zelluläre Fortsätze, um die Bowman-Kapsel wieder zu bedecken. Im Verlauf persistierte dieser Prozess und es bildete sich das typische Bild extrakapillarer Prolifere mit den typischen periglomerulären Infiltraten (Immunfluoreszenz-Markierung für MHCII, CD11b, CD86). Dabei zeigten sich die Podozyten im gesamten Zeitverlauf als negativ für Aktivierungs- bzw. Dedifferenzierungsmarker (Immunfluoreszenz mittels indirekter Doppelmarkierung für Desmin und Podocin). Interessanterweise kam es zu keinem Zeitpunkt zur Formation einer FSGS. Als möglicher Grund konnte das Fehlen der typischen Adhäsionen zwischen aktivierten Parietalzellen und Podozyten („point of no return“) in den späten Zeitpunkten der Doxyzyklinbehandlung ausgemacht werden.

Die Verpaarung des hier untersuchten Mausmodells mit der Thy 1.1 Maus, als FSGS-Modell brachte keine weiteren Erkenntnisse.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass das hier untersuchte PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup> Mausmodell erstmalig erfolgreich eine partielle Ablation von PECs ermöglicht.

## 6 SUMMARY

Acute glomerular lesions are often associated with pathological proliferation of cells within the glomerular capsule, which finally leads to the formation of renal insufficiency. Especially in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and the rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) these pathological proliferations are a pathognomonic finding. In recent years many scientific studies aimed to answer the question of the trigger for these diseases. Initially the mesangial cell as well as the visceral epithelial cell of the glomerulus, the podocyte, was in the focus of research. Parietal epithelial cells (PECs) just recently received an increasing amount of attention because of the fact, that they represent the largest population of cells involved in the proliferations in RPGN. In the present study, a transgenic system was used to ablate PECs in a doxycycline inducible fashion. For this purpose a novel transgenic system was developed in which expression of an attenuated DTA (diphtheria toxin) was irreversibly activated upon Cre recombination within the target cells.

To induce the PEC ablation, mice received 2 mg/ml doxycycline via drinking water for a maximum of 14 days. Histological examinations of kidneys from transgenic animals were performed at different timepoints of the experiment. Untreated animals (control group 1) and treated DTA wild type mice (control group 2) were used for comparison. Particularly on day 9 PAS reaction showed proteinuria within Bowman's space and swollen PECs in approximately 30% of glomeruli. The TUNEL assay visualizing fragmentation of DNA, which is typically observed in DTA treated cells, showed a subpopulation of glomeruli stained positive at any point of the treatment. To quantify the PEC loss an immunohistochemical staining for PAX-8 was performed. The analysis showed a loss of about 30 % of the Pax-8 positive PECs on day 9 of doxycycline treatment. Since only 30% of the glomeruli were affected by the ablation it was assumed that 50-90 % of the PECs died in an affected glomerulus. After doxycycline administration was terminated on day 14, PEC numbers increased.

The X-gal staining, which marks  $\beta$ -galactosidase activity, which also is expressed under the ROSA promoter, was another indication of a significant decrease in PEC numbers in the treated transgenic animals. Finally, the analysis of the ultrastructure (methylene blue stained semi-thin sections and transmission-electronmicroscopy images) showed

the at least partial successful ablation of the PECs in the animal model used in this study.

The analysis of urine samples from mice of both control groups and those of quadruple transgenic mice at different time points of the doxycycline treatment showed a significant, progressive and selective albuminuria during acute PEC ablation. Also, the immunohistochemical detection of albumin and megalin in the kidneys of animals confirmed the results of the urine analyzes, especially with regard to the selectivity of proteinuria. After termination of the doxycycline treatment, albuminuria proved to be completely reversible, which confirmed the assumption that a close relationship between the partial ablation of PECs and the albuminuria does exist. Because the PECs are no intimate part of the filtration barrier, an effort had to be taken to investigate the nature of the albuminuria. The most common reason for the occurrence of a selective proteinuria is the focal fusion of the processes of podocytes, the so called "foot process effacement ". This could be detected in TEM images of quadruple transgenic mice kidneys on day 9 of induction of ablation in 30% of podocytes. The foot process effacement could be seen only in the vicinity of altered PECs. An acute obstruction of the proximal tubule as another possible cause of the changes in the filtration barrier and the albuminuria could be excluded by the examination of kidneys of mice after injection of gold-labeled BSA.

As was already known from the PEC-rtTA/LC1-mice that the promoter is active in parts of the tubular system, stainings were performed using specific immunohistochemical markers for different parts of the tubular system. It could be observed .that as expected only minor morphological changes in the tubular system occurred, and primarily the thick ascending limb of Henle was affected.

Surprisingly, the number of WT-1 labeled cells (transcription factor and podocyte marker) increased during treatment with doxycycline slightly. Therefore an effort was undertaken to test the possibility that the PEC-rtTA transgene might also mediate ectopic cell ablation in podocytes. PEC-rtTA/LC1/ROSADTA176 mice were crossbred with tetO7-HIST1H2BJ/GFP mice. Neither before nor after doxycycline treatment any other cell in the glomerulus than the remaining PECs proved to be eGFP positive. The decrease in WT-1 positive cells could be explained by the so-called parietal podocytes.

Thus, no ectopic activity of the PEC rtTA transgene could be observed in podocytes in this model.

Because of the subtotal pattern of the PEC ablation the behavior of the remaining PECs was examined. Starting at day 4 *de novo* expression of CD44 (PEC activation marker) could be detected. Later, the remaining PECs proliferated and formed cellular extensions to re-cover the denuded Bowman's capsule. Towards later stages this process persisted which led to extracapillary proliferations with the typical periglomerular infiltrates (immunofluorescence labeling for MHC II, CD11, CD86). The podocytes were not affected (tested by indirect immunofluorescence double labeling for desmin and podocin).

Interestingly, the histological picture of an FSGS could not be detected at any timepoint. As a possible reason the lack of the typical adhesions between parietal cells and activated podocytes could be specified.

The crossbreeding of the mouse model described in this study and the Thy 1.1 model, as a FSGS model, did not yield any further insights.

In summary the PEC-rtTA/LC1/ROSA<sup>DTA176</sup> mouse model examined in this study could successfully be used to partially ablate PECs for the first time.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	micromolar
A	<i>Arteria</i>
Aa	<i>Arteriae</i>
Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
ad	addiere
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ANCA	anti-neurophil cytoplasmic antibody
APA	Aminopeptidase
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines serum albumin
CD2AP	CD2-associated protein
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
cm	Zentimeter
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTGF	connective tissue growth factor
DAB	Diaminobenzidin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser

DMF	N,N Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DT	Diphtherietoxin
DTA	A-Kette des Diphtherietoxins
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-2	Elongationsfaktor 2
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK 1/2	extracellular regulated kinase 1/2
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FSGS	fokale segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
G	Gravitationskraft
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GN	<i>Glomerulonephritis</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
HCL	Salzsäure
HI-Virus	humanes Immundefizienz Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen

HRP	Meerrettichperoxidase
HZV	Herzminutenvolumen
IgG	Immunglobulin G
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Kaliumhexacyanidoferrat (III)
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Kaliumhexacyanidoferrat (II)
Ka <sup>+</sup>	Kalium-Ion
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Krea	Kreatinin
l	Liter
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
lat.	lateinisch
loxP	locus of crossover of bacteriophage P
LTA	<i>Lotus Tetragonulobus</i>
M	molar
MAP	mitogen activated
MCP1	monocyte chemoattractant protein-1
mg	Milligramm
MHCII	major histocompatibility complex II
min	Minute
MIP 1 $\alpha/\beta$	macrophage inflammatory protein 1 $\alpha/\beta$
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mPGEs	microsomal prostaglandin E synthase
MPO	Myeloperoxidase

Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
NHE	Na <sup>+</sup> H <sup>+</sup> Austauscher
NKCC2	Na <sup>+</sup> :Cl <sup>-</sup> :K <sup>+</sup> Cotransporter
nm	Nanometer
NOS	not otherwise specified
O <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
P(eff)	effektiver Filtrationsdruck
Pax-8/2	paired-box gene 8/2
P <sub>Bow</sub>	Filtrationsdruck des Bowmansch`en Raums
PBS	phosphate bufferd saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF-D	platelet derived growth factor
PEC	Parietalzelle
PFA	Paraformaldehyd
P <sub>Kap</sub>	Filtrationsdruck der Kapillare
PR3	Proteinase 3
r	Radius
RAS	Renin-Angiotensin System
RBE	Rekombinase-Bindungs-Elemente
RES	reticuloendotheliales System
RPF	renaler Plasmafluss
RPGN	rasch progressive <i>Glomerulonephritis</i>
rtTA	reverser Tetrazyklin Transaktivator
SDS	Sodium dodecyl sulphate

sec	Sekunden
$S_g$	Siebkoefizient
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST	Tris buffered saline and Tween
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase
TEM	Transelectronenmikroskopie
TGF	tubuloglomeruläres Feedback
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
THP	Tamm horsfall protein
TMB	Tetramethylbenzidin
TRE	tetracyclin responsive element
tTA	Tetrazyklin Transaktivator
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nickend labeling
V	Volt
V.	<i>Vena</i>
Vhlh	Von Hippel–Lindau-Gen
Vv	<i>Venae</i>
WT 1	Wilms-Tumor 1
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
$\alpha 3(IV)NC1$	$\alpha 3$ chain non-collagen I domain of type IV collagen
$\beta$	beta
$\lambda$	lambda

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1: Formen der FSGS.....	17
Tab. 1.2 Klassifikation der ANCA-assoziierten <i>Glomerulonephritis</i> .....	21
Tab. 2.1: Verwendete Geräte. ....	34
Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial. ....	35
Tab. 2.3: Benutzte Chemikalien. ....	37
Tab. 2.4: Rezept für TBST. ....	37
Tab. 2.5: Herstellung von ½ Karnovsky für die Gewebefixierung (TEM). ....	38
Tab. 2.6: Herstellung von Methylgrün für die Immunhistochemie. ....	38
Tab. 2.7: Herstellung von 50x TAE Puffer für die Gelelektrophorese.....	39
Tab. 2.8: Herstellung von 5x Puffer nach Laemmli für SDS-Gele.....	40
Tab. 2.9: Ansatz der Perfusionslösung für die Gewebefixierung.....	39
Tab. 2.10: Herstellung von Post Fix für die Behandlung von Kryoschnitten. ....	39
Tab. 2.11: Herstellung des Transferpuffers für die SDS-Gele. ....	40
Tab. 2.12: Rezept für die X-Gal-Färbelösung. ....	41
Tab. 2.13: Lösungen und Puffer. ....	42
Tab. 2.14: Erstantikörper für die Immunfluoreszenz der periglomerulären Infiltrate. ....	42
Tab. 2.15: Erstantikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. ....	43
Tab. 2.16: Zweitantikörper .....	44
Tab. 2.17: Kommerzielle Kits, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden. ....	45
Tab. 2.18 Primerpaare für die Genotypisierungen .....	46
Tab. 2.19 Eingesetzte Enzyme .....	46
Tab. 2.20 Narkotika für die Arbeit mit den Mäusen.....	46
Tab. 2.21 Software, die zur Bearbeitung der Bilder und der Erstellung der Grafiken verwendet wurde.....	47

Tab. 2.22: Schema zur Herstellung der Standardreihe für den Albumin ELISA.....	54
Tab. 2.23: Ansatz für 10 ml X-Gal Lösung .....	63

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Anatomie der menschlichen Niere.....	3
Abb. 1.2: Aufbau eines <i>Glomerulum</i> .....	4
Abb. 1.3: Der dreischichtige glomeruläre Filter.....	7
Abb. 1.4: Formen der rasch progressiven <i>Glomerulonephritis</i> (Halbmondnephritis)....	19
Abb. 1.5: Klassische Histologie einer an RPGN erkrankten Niere. ....	22
Abb. 1.6: Schema der Transgene der für diese Arbeit verwendeten Mäuse. ....	31
Abb. 2.1: Agarose-Gel (2%) einer DTA PCR.....	49
Abb. 2.2: Beispielbild eines Metabolismus-Käfigs für Mäuse.....	51
Abb. 2.3: Reaktionsprinzip der VITROS CREA-Methode .....	55
Abb. 2.4: Funktionsprinzip von Immunfärbungen.....	61
Abb. 3.1: Zeitlicher Verlauf des Versuches. ....	66
Abb. 3.2: Veränderung des glomerulären Phänotyps während der PEC-Ablation.....	68
Abb. 3.3: Nachweis der Funktionalität des transgenen Ablationsmodells.....	69
Abb. 3.4: X-Gal-Färbung.....	71
Abb. 3.5: Untersuchung der Ultrastruktur der <i>Glomerula</i> . ....	73
Abb. 3.6: Parietalzellablation induziert Permeabilitätsdefekte der Filtrationsbarriere. 77	
Abb. 3.7: Parietalzellablation führt zu einer selektiven Proteinurie. ....	79
Abb. 3.8: Analyse der Podozyten.....	83
Abb. 3.9: Serienschnitte eines betroffenen <i>Glomerulum</i> .....	84
Abb. 3.10: Der Phänotyp des tubulären Systems .....	85
Abb. 3.11: Markierung verschiedener Tubulusabschnitte durch Immunfluoreszenz. ...	87
Abb. 3.12: Proliferation in Papille und Kortex während der PEC-Ablation. ....	89
Abb. 3.13: Gold-markiertes BSA als Tracer zum Nachweis tubulärer Durchgängigkeit. 93	

Abb. 3.14: Keine ektopische Zellablation im *Glomerulum*. ..... 94

Abb. 3.15: Aktivierung der verbliebenen PECs während der partiellen Ablation. .... 96

Abb. 3.16: Aktivierung der PECs während der partiellen Ablation II..... 100

Abb. 3.17: Keine Aktivierung der Podozyten..... 101

Abb. 3.18: Transmissionselektronenmikroskopie muriner Nieren: Tag 9 der Ablation102

Abb. 3.19: Proliferation verbliebener PECs führt zur Bildung zellulärer Halbmonde. . 104

Abb. 3.20: Analyse der Ultrastruktur der zellulären Halbmonde..... 105

Abb. 3.21: Typische periglomeruläre Infiltrate..... 107

Abb. 3.22: Keine Adhäsionen zwischen PECS und Podozyten..... 107

Abb. 3.23: Histologischer Vergleich von Thy 1.1 und Thy 1.1 plus DTA ..... 108

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- Abremski, K, R Hoess, and N Sternberg (1983), "Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination.," *Cell*, 32(4), 1301–11.
- Abremski, K, and R Hoess (1984), "Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein.," *The Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 1509–14.
- — — (1985), "Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products.," *Journal of Molecular Biology*, 184(2), 211–20.
- Adams, J C (1992), "Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains.," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 40(10), 1457–63.
- Adebajo, A O, P Charles, R N Maini, and B L Hazleman (1993), "Autoantibodies in malaria, tuberculosis and hepatitis B in a west African population.," *Clinical and Experimental Immunology*, 92(1), 73–76.
- Adler, S (1992), "Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors.," *The American Journal of Pathology*, 141(3), 571–78.
- Anders, H-J, and D Muruve (2011), "The inflammasomes in kidney disease.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(6), 1007–18.
- Appel, D, D B Kershaw, B Smeets, G Yuan, A Fuss, B Frye, M Elger, W Kriz, J Floege, and M J Moeller (2009), "Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 333–43.
- Arakawa, M, and J Tokunaga (1977), "A scanning electron microscope study of the human Bowman's epithelium.," *Contributions to Nephrology*, 6, 73–78.
- Arias, L F (n.d.), "Kidney pathology,"  
<[http://www.kidneypathology.com/English\\_version/Crescentic\\_GN.html](http://www.kidneypathology.com/English_version/Crescentic_GN.html)> (Sep. 14, 2013).
- Asano, T, F Niimura, I Pastan, A Fogo, I Ichikawa, and T Matsusaka (2005), "Permanent genetic tagging of podocytes: fate of injured podocytes in a mouse model of glomerular sclerosis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(8), 2257–62.

- Assmann, K J M, J P H F van Son, H B P M Dijkman, S Mentzel, and J F M Wetzels (2002), "Antibody-induced albuminuria and accelerated focal glomerulosclerosis in the Thy-1.1 transgenic mouse.," *Kidney International*, 62(1), 116–26.
- Baggaley, A (2002), *Anatomieatlas*, London: Dorling Kindersley.
- Bariéty, J, P Bruneval, A Meyrier, C Mandet, G Hill, and C Jacquot (2005), "Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis.," *Kidney International*, 68(3), 1109–19.
- Baron, U, S Freundlieb, M Gossen, and H Bujard (1995), "Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter.," *Nucleic Acids Research*, 23(17), 3605–6.
- Basgen, J M, S B Nicholas, M Mauer, S Rozen, and J R Nyengaard (2006), "Comparison of methods for counting cells in the mouse glomerulus.," *Nephron Experimental Nephrology*, 103(4), e139–48.
- Bayliss, W M (1902), "On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure.," *The Journal of Physiology*, 28(3), 220–31.
- Beckers, G, H Mann, H Melzer, B Bemelmans, G Jakse, and D Rohrmann (2008), "Urinary sodium dodecyl sulfate electrophoresis with silver staining: a noninvasive diagnostic tool for obstructive uropathy in children.," *The Journal of Urology*, 179(2), 703–7.
- Bell, P D, J Y Lapointe, and J Peti-Peterdi (2003), "Macula densa cell signaling.," *Annual Review of Physiology*, 65, 481–500.
- Berden, A E, F Ferrario, E C Hagen, D R Jayne, J C Jennette, K Joh, I Neumann, L-H Noël, C D Pusey, R Waldherr, J A Bruijn, and I M Bajema (2010), "Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(10), 1628–36.
- Berens, C, and W Hillen (2003), "Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes.," *European Journal of Biochemistry*, 270(15), 3109–21.
- Bergtold, A, A Gavhane, V D'Agati, M Madaio, and R Clynes (2006), "FcR-bearing myeloid cells are responsible for triggering murine lupus nephritis.," *Journal of Immunology*, 177(10), 7287–95.
- Bertram, J F, M C Soosaipillai, S D Ricardo, and G B Ryan (1992), "Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney.," *Cell and Tissue Research*, 270(1), 37–45.
- Birck, R, and F J Van der Woude (2003), "Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenesis and clinical management.," *Der Internist*, 44(9), 1107–19.

- Bockamp, E, M Maringer, C Spangenberg, S Fees, S Fraser, L Eshkind, F Oesch, and B Zabel (2002), "Of mice and models: improved animal models for biomedical research.," *Physiological Genomics*, 11(3), 115–32.
- Bohrer, M P, C Baylis, H D Humes, R J Glassock, C R Robertson, and B M Brenner (1978), "Permeability of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations.," *The Journal of Clinical Investigation*, 61(1), 72–78.
- Bollée, G, M Flamant, S Schordan, C Fligny, E Rumpel, M Milon, E Schordan, N Sabaa, S Vandermeersch, A Galaup, A Rodenas, I Casal, S W Sunnarborg, D J Salant, J B Kopp, D W Threadgill, S E Quaggin, J-C Dussaule, S Germain, L Mesnard, K Endlich, C Boucheix, X Belenfant, P Callard, N Endlich, and P-L Tharaux (2011), "Epidermal growth factor receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis.," *Nature Medicine*, 17(10), 1242–50.
- Borza, D B, K O Netzer, A Leinonen, P Todd, J Cervera, J Saus, and B G Hudson (2000), "The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain.," *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 6030–37.
- Boucher, A, D Droz, E Adafer, and L H Noël (1987), "Relationship between the integrity of Bowman's capsule and the composition of cellular crescents in human crescentic glomerulonephritis.," *Laboratory Investigation*, 56(5), 526–33.
- Boute, N, O Gribouval, S Roselli, F Benessy, H Lee, A Fuchshuber, K Dahan, M C Gubler, P Niaudet, and C Antignac (2000), "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome.," *Nature Genetics*, 24(4), 349–54.
- Brenner, B M, L D Dworkin, and I Ichikawa (1986), "Glomerular Ultrafiltration," in *The Kidney*, 3.Edition, 124–44.
- Brenner, B.M., R. Zatz, and I. Ichikawa (1986), "The Renal Circulation," in *The Kidney*, 3.Edition, 93–126.
- Brinster, R L, H Y Chen, R Warren, A Sarthy, and R D Palmiter (1982), "Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs.," *Nature*, 296(5852), 39–42.
- Bruggeman, L A, M D Ross, N Tanji, A Cara, S Dikman, R E Gordon, G C Burns, V D D'Agati, J A Winston, M E Klotman, and P E Klotman (2000), "Renal epithelium is a previously unrecognized site of HIV-1 infection.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(11), 2079–87.
- Burg, M B, and N Green (1973), "Function of the thick ascending limb of Henle's loop.," *The American Journal of Physiology*, 224(3), 659–68.

- Cai, G, P Chen, D Wu, S Shi, Z Yin, X Zhang, R Wei, and X Chen (2008), "IgA deposits along glomerular basement membranes in rapidly progressive glomerulonephritis.," *Southern Medical Journal*, 101(9), 945–47.
- Carey, R M, and H M Siragy (2003), "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation.," *Endocrine Reviews*, 24(3), 261–71.
- Chalfie, M, Y Tu, G Euskirchen, W W Ward, and D C Prasher (1994), "Green fluorescent protein as a marker for gene expression.," *Science*, 263(5148), 802–5.
- Chang, R L, I F Ueki, J L Troy, W M Deen, C R Robertson, and B M Brenner (1975), "Permeability of the glomerular capillary wall to macromolecules. II. Experimental studies in rats using neutral dextran.," *Biophysical Journal*, 15(9), 887–906.
- Chien, A, D B Edgar, and J M Trela (1976), "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.," *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–57.
- Choe, S, M J Bennett, G Fujii, P M Curmi, K A Kantardjieff, R J Collier, and D Eisenberg (1992), "The crystal structure of diphtheria toxin.," *Nature*, 357(6375), 216–22.
- Christensen, E I, and H Birn (2001), "Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule.," *American Journal of Physiology*, 280(4), F562–73.
- Clarke, M C H, N Figg, J J Maguire, A P Davenport, M Goddard, T D Littlewood, and M R Bennett (2006), "Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis.," *Nature Medicine*, 12(9), 1075–80.
- Clynes, R, C Dumitru, and J V Ravetch (1998), "Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis.," *Science*, 279(5353), 1052–54.
- Cockcroft, D W, and M H Gault (1976), "Prediction of creatinine clearance from serum creatinine.," *Nephron*, 16(1), 31–41.
- Cockwell, P, C J Brooks, D Adu, and C O Savage (1999), "Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis.," *Kidney International*, 55(3), 852–63.
- Cockwell, P, A J Howie, D Adu, and C O Savage (1998), "In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis.," *Kidney International*, 54(3), 827–36.
- Collier, R J (1967), "Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors.," *Journal of Molecular Biology*, 25(1), 83–98.

- — — (2001), "Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century.," *Toxicon*, 39(11), 1793–1803.
- Collier, R J, and J Kandel (1971), "Structure and activity of diphtheria toxin. I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymically active and inactive fragments.," *The Journal of Biological Chemistry*, 246(5), 1496–1503.
- Coons, A H, and M H Kaplan (1950), "Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.," *The Journal of Experimental Medicine*, 91(1), 1–13.
- Counahan, R, C Chantler, S Ghazali, B Kirkwood, F Rose, and T M Barratt (1976), "Estimation of glomerular filtration rate from plasma creatinine concentration in children.," *Archives of Disease in Childhood*, 51(11), 875–78.
- Cruchaud, A, F Chenais, G J Fournié, L Humair, P H Lambert, J C Mulli, and F Chatelanat (1975), "Immune complex deposits in systemic lupus erythematosus kidney without histological or functional alterations.," *European Journal of Clinical Investigation*, 5(3), 297–309.
- Despopoulos, A, and S Silbernagl (2007), *Taschenatlas Physiologie, 4. Auflage*, Georg Thieme Verlag, 441.
- Dijkman, H, B Smeets, J van der Laak, E Steenbergen, and J Wetzels (2005), "The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis.," *Kidney International*, 68(4), 1562–72.
- Ding, M, S Cui, C Li, S Jothy, V Haase, B M Steer, P Marsden, J Pippin, S Shankland, M P Rastaldi, C D Cohen, M Kretzler, and S E Quaggin (2006), "Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice.," *Nature Medicine*, 12(9), 1081–87.
- Donoviel, D B, D D Freed, H Vogel, D G Potter, E Hawkins, J P Barrish, B N Mathur, C A Turner, R Geske, C A Montgomery, M Starbuck, M Brandt, A Gupta, R Ramirez-Solis, B P Zambrowicz, and D R Powell (2001), "Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN.," *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), 4829–36.
- Drenckhahn, D, and R P Franke (1988), "Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man.," *Laboratory Investigation*, 59(5), 673–82.
- Van Duyne, G D (2001), "A structural view of cre-loxp site-specific recombination.," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30, 87–104.
- D'Agati, V D (2012), "Pathobiology of focal segmental glomerulosclerosis: new developments.," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 21(3), 243–50.

- D'Agati, V D, A B Fogo, J A Bruijn, and J C Jennette (2004), "Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal.," *American Journal of Kidney Diseases*, 43(2), 368–82.
- D'Agati, V D, F J Kaskel, and R J Falk (2011), "Focal segmental glomerulosclerosis.," *The New England Journal of Medicine*, 365(25), 2398–2411.
- Elger, M, and W Kriz (1998), "Nephrology Dialysis Transplantation Podocytes and the development of segmental glomerulosclerosis," *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13, 1368–73.
- Engvall, E, and P Perlmann (1971), "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.," *Immunochemistry*, 8(9), 871–74.
- Falk, R J, and J C Jennette (1988), "Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis.," *The New England Journal of Medicine*, 318(25), 1651–57.
- Faraggiana, T, F Malchiodi, A Prado, and J Churg (1982), "Lectin-peroxidase conjugate reactivity in normal human kidney.," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30(5), 451–58.
- Farquhar, M G, and G E Palade (1962), "Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus : Phagocytosis of Filtration Residues by a Distinctive 'Third' Cell.," *The Journal of Cell Biology*, 13(1), 55–87.
- Fatima, H, M J Moeller, B Smeets, H Yang, V D D'Agati, E Alpers, and B Fogo (2012), "Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant.," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(11), 1852–58.
- Faul, C, M Donnelly, S Merscher-Gomez, Y H Chang, S Franz, J Delfgaauw, J-M Chang, H Y Choi, K N Campbell, K Kim, J Reiser, and P Mundel (2008), "The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A.," *Nature Medicine*, 14(9), 931–38.
- Floege, J, C E Alpers, M W Burns, P Pritzl, K Gordon, W G Couser, and R J Johnson (1992), "Glomerular cells, extracellular matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant kidney model.," *Laboratory Investigation*, 66(4), 485–97.
- Friedman, E A, and T K Tao (1995), "Disappearance of uremia due to heroin-associated nephropathy.," *American Journal of Kidney Diseases*, 25(5), 689–93.
- Fujinaka, Hi, M Nameta, P Kovalenko, As Matsuki, N Kato, G Nishimoto, Y Yoshida, E Yaoita, M Naito, I Kihara, S Tomizawa, and T Yamamoto (2007), "Periglomerular accumulation of dendritic cells in rat crescentic glomerulonephritis.," *Journal of Nephrology*, 20(3), 357–63.

- Förger, F, T Matthias, M Oppermann, H Becker, and K Helmke (2004), "Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis.," *Lupus*, 13(1), 36–44.
- Gavrieli, Y, Y Sherman, and S A Ben-Sasson (1992), "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.," *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493–501.
- Genovese, G, D J Friedman, M D Ross, L Lecordier, P Uzureau, B I Freedman, D W Bowden, C D Langefeld, T K Oleksyk, A L Uscinski Knob, A J Bernhardt, P J Hicks, G W Nelson, B Vanhollebeke, C A Winkler, J B Kopp, E Pays, and M R Pollak (2010), "Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans.," *Science*, 329(5993), 841–45.
- Ghim, C-M, S K Lee, S Takayama, and R J Mitchell (2010), "The art of reporter proteins in science: past, present and future applications.," *BMB Reports*, 43(7), 451–60.
- Gibson, I W, I Downie, T T Downie, S W Han, I A More, and G B Lindop (1992), "The parietal podocyte: a study of the vascular pole of the human glomerulus.," *Kidney International*, 41(1), 211–14.
- Gokhale, J A, M D McKee, and S R Khan (1996), "Immunocytochemical localization of Tamm-Horsfall protein in the kidneys of normal and nephrolithic rats.," *Urological Research*, 24(4), 201–9.
- Good, K S, K O'Brien, G Schulman, D Kerjaschki, and A B Fogo (2004), "Unexplained nephrotic-range proteinuria in a 38-year-old man: a case of 'no change disease'.," *American Journal of Kidney Diseases*, 43(5), 933–38.
- Gordon, V M, and S H Leppla (1994), "Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases.," *Infection and Immunity*, 62(2), 333–40.
- Gossen, M, S Freundlieb, G Bender, G Müller, W Hillen, and H Bujard (1995), "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.," *Science*, 268(5218), 1766–69.
- Gossen, M, and H Bujard (1992), "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5547–51.
- Grasl-Kraupp, B, B Ruttkay-Nedecky, H Koudelka, K Bukowska, W Bursch, and R Schulte-Hermann (1995), "In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.," *Hepatology*, 21(5), 1465–68.
- Grgic, I, G Campanholle, V Bijol, C Wang, V S Sabbisetti, T Ichimura, B D Humphreys, and J V Bonventre (2012), "Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis.," *Kidney International*, (88(2)), 172–83.

- Grosveld, F, and G Kollias (1988), "Ectopic expression of Thy-1 in the kidneys of transgenic mice induces functional and proliferative abnormalities.," *Cell*, 54(7), 920.
- Guasch, A, W M Deen, and B D Myers (1993), "Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans.," *The Journal of Clinical Investigation*, 92(5), 2274–82.
- Guet, C C, M B Elowitz, W Hsing, and S Leibler (2002), "Combinatorial synthesis of genetic networks.," *Science*, 296(5572), 1466–70.
- Guettier, C, D Nochy, C Jacquot, C Mandet, J P Camilleri, and J Bariety (1986), "Immunohistochemical demonstration of parietal epithelial cells and macrophages in human proliferative extra-capillary lesions.," *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 409(5), 739–48.
- Haas, M, S M Meehan, T G Karrison, and B H Spargo (1997), "Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997.," *American Journal of Kidney Diseases*, 30(5), 621–31.
- Harris, R C, J A McKanna, Y Akai, H R Jacobson, R N Dubois, and M D Breyer (1994), "Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction.," *The Journal of Clinical Investigation*, 94(6), 2504–10.
- Harrison, D J, and M K MacDonald (1986), "The origin of cells in the glomerular crescent investigated by the use of monoclonal antibodies.," *Histopathology*, 10(9), 945–52.
- Hausmann, R, C Kuppe, H Egger, F Schweda, V Knecht, M Elger, S Menzel, D Somers, G Braun, A Fuss, S Uhlig, W Kriz, G Tanner, J Floege, and M J Moeller (2010), "Electrical forces determine glomerular permeability.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(12), 2053–58.
- Hees, H, and F Sinowatz (2006), *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, Selbstverlag, S. 496.
- Henle, J (1862), *Zur Anatomie der Niere (Google eBook)*, Dieterichsche Buchhandlung, 3–34.
- Herlitz, L C, G S Markowitz, A B Farris, J A Schwimmer, M B Stokes, C Kunis, R B Colvin, and V D D'Agati (2010), "Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(1), 163–72.
- Heymann, F, C Meyer-Schwesinger, E E Hamilton-Williams, L Hammerich, U Panzer, S Kaden, S E Quaggin, J Floege, H-J Gröne, and C Kurts (2009), "Kidney dendritic cell

- activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury.," *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1286–97.
- Hinkes, B G, B Mucha, C N Vlangos, R Gbadegesin, J Liu, K Hasselbacher, D Hangan, F Ozaltin, M Zenker, and F Hildebrandt (2007), "Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2).," *Pediatrics*, 119(4), e907–19.
- Le Hir, M, C Keller, V Eschmann, B Hähnel, H Hosser, and W Kriz (2001), "Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(10), 2060–71.
- Le Hir, M, and V Besse-Eschmann (2003), "A novel mechanism of nephron loss in a murine model of crescentic glomerulonephritis.," *Kidney International*, 63(2), 591–99.
- Hodgin, J B, M Rasoulpour, G S Markowitz, and V D D'Agati (2009), "Very low birth weight is a risk factor for secondary focal segmental glomerulosclerosis.," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(1), 71–76.
- Hoess, R H, M Ziese, and N Sternberg (1982), "P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(11), 3398–3402.
- Honjo, T, Y Nishizuka, O Hayaishi, and I Kato (1968), "Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis.," *Journal of Biological Chemistry*, 243(12), 3553–55.
- Howie, A J, T Pankhurst, S Sarioglu, N Turhan, and D Adu (2005), "Evolution of nephrotic-associated focal segmental glomerulosclerosis and relation to the glomerular tip lesion.," *Kidney International*, 67(3), 987–1001.
- Ichikawa, I, J Ma, M Motojima, and T Matsusaka (2005), "Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis.," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14(3), 205–10.
- Ichimura, K, H Kurihara, and T Sakai (2003), "Actin filament organization of foot processes in rat podocytes.," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 51(12), 1589–1600.
- Igarashi, P (2003), "Following the expression of a kidney-specific gene from early development to adulthood.," *Experimental Nephrology*, 94(1), e1–6.
- Inoue, T, E Yaoita, H Kurihara, F Shimizu, T Sakai, T Kobayashi, K Ohshiro, H Kawachi, H Okada, H Suzuki, I Kihara, and T Yamamoto (2001), "FAT is a component of glomerular slit diaphragms.," *Kidney International*, 59(3), 1003–12.

- Ito, Y, R Goldschmeding, R Bende, N Claessen, M Chand, L Kleij, T Rabelink, J Weening, and J Aten (2001), "Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(3), 472–84.
- Iwama, H, S Horikoshi, I Shirato, and Y Tomino (1998), "Epstein-Barr virus detection in kidney biopsy specimens correlates with glomerular mesangial injury.," *American Journal of Kidney Diseases*, 32(5), 785–93.
- Jacobson, H R (1991), "Chronic renal failure: pathophysiology.," *Lancet*, 338(8764), 419–23.
- Jenne, D E, J Tschopp, J Lüdemann, B Utecht, and W L Gross (1990), "Wegener's autoantigen decoded.," *Nature*, 346(6284), 520.
- Jennette, J C, and D B Thomas (2001), "Crescentic glomerulonephritis.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 16 Suppl 6, 80–82.
- Jennette, J. C, and R H. Heptinstall (2007), *Heptinstall's Pathology Of The Kidney, Volume 1*, Lippincott Williams & Wilkins, 1–31; 156–95.
- Kabgani, N, T Grigoleit, K Schulte, A Sechi, S Sauer-Lehnen, C Tag, P Boor, C Kuppe, G Warsow, S Schordan, J Mostertz, R K Chilukoti, G Homuth, N Endlich, F Tacke, R Weiskirchen, G Fuellen, Karlhans Endlich, Jürgen Floege, Bart Smeets, and Marcus J Moeller (2012), "Primary cultures of glomerular parietal epithelial cells or podocytes with proven origin.," *Plos One*, 7(4), e34907.
- Kalluri, R, C B Wilson, M Weber, S Gunwar, A M Chonko, E G Neilson, and B G Hudson (1995), "Identification of the alpha 3 chain of type IV collagen as the common autoantigen in antibasement membrane disease and Goodpasture syndrome.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 6(4), 1178–85.
- Kambham, N, G S Markowitz, A M Valeri, J Lin, and V D D'Agati (2001), "Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic.," *Kidney International*, 59(4), 1498–1509.
- Kanemoto, K, J Usui, S Tomari, H Yokoi, M Mukoyama, J Aten, J J Weening, and M Nagata (2003), "Connective tissue growth factor participates in scar formation of crescentic glomerulonephritis.," *Laboratory Investigation*, 83(11), 1615–25.
- Kao, W H L, M J Klag, L A Meoni, D Reich, Y Berthier-Schaad, M Li, J Coresh, N Patterson, A Tandon, N R Powe, N E Fink, J H Sadler, M R Weir, H E Abboud, S G Adler, J Divers, S K Iyengar, B I Freedman, P L Kimmel, W C Knowler, O F Kohn, K Kramp, D J Leehey, S B Nicholas, M V Pahl, J R Schelling, J R Sedor, D Thornley-Brown, C A Winkler, M W Smith, and R S Parekh (2008), "MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans.," *Nature Genetics*, 40(10), 1185–92.
- Kashgarian, M, and R B Sterzel (1992), "The pathobiology of the mesangium.," *Kidney International*, 41(3), 524–29.

- Kerjaschki, D (2001), "Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis.," *The Journal of Clinical Investigation*, 108(11), 1583–87.
- Kershaw, D B, P E Thomas, B L Wharram, M Goyal, J E Wiggins, C I Whiteside, and R C Wiggins (1995), "Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium.," *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29439–46.
- Kestilä, M, U Lenkkeri, M Männikkö, J Lamerdin, P McCready, H Putaala, V Ruotsalainen, T Morita, M Nissinen, R Herva, C E Kashtan, L Peltonen, C Holmberg, A Olsen, and K Tryggvason (1998), "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome.," *Molecular Cell*, 1(4), 575–82.
- Kiuchi-Saishin, Y, S Gotoh, M Furuse, A Takasuga, Y Tano, and S Tsukita (2002), "Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(4), 875–86.
- Klinke, R, and S Silbernagel (1994), *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag, 808.
- Klock, G, U Strähle, and G Schütz (1987), "Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct.," *Nature*, 329(6141), 734–36.
- Knepper, M A., G Kim, P Fernandes-LLama, and C A. Ecelbarger (1999), "Regulation of thick ascending limb transport by vasopressin," *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(3), 628–34.
- Kollias, G, D J Evans, M Ritter, J Beech, R Morris, and F Grosveld (1987), "Ectopic expression of Thy-1 in the kidneys of transgenic mice induces functional and proliferative abnormalities.," *Cell*, 51(1), 21–31.
- Korbet, S M (1998), "Primary focal segmental glomerulosclerosis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(7), 1333–40.
- Kretzler, M, I Koeppen-Hagemann, and W Kriz (1994), "Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat.," *Virchows Archiv*, 425(2), 181–93.
- Kriz, W, M Elger, M Nagata, M Kretzler, S Uiker, I Koeppen-Hageman, S Tenschert, and K V Lemley (1994), "The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis.," *Kidney International. Supplement*, 45, S64–72.
- Kriz, W, I Hartmann, H Hosser, B Hähnel, B Kränzlin, A Provoost, and N Gretz (2001), "Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(3), 496–506.

- Kriz, W, H Hosser, B Hähnel, J L Simons, and A P Provoost (1998), "Development of vascular pole-associated glomerulosclerosis in the Fawn-hooded rat.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(3), 381–96.
- Kriz, W, B Hähnel, S Rösener, and M Elger (1995), "Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis.," *Kidney International*, 48(5), 1435–50.
- Kriz, W, M Kretzler, M Nagata, A P Provoost, I Shirato, S Uiker, T Sakai, and K V Lemley (1996), "A frequent pathway to glomerulosclerosis: deterioration of tuft architecture-podocyte damage-segmental sclerosis.," *Kidney & Blood Pressure Research*, 19(5), 245–53.
- Kuhlmann, U, and D Walb (2008), *Nephrologie: Pathophysiologie- Klinik- Nierenersatzverfahren*, Georg Thieme Verlag, S.55–60.
- Kussmaul, A, and R Maier (1866), "Über eine bisher nicht beschriebene eigenthümliche Arterienerkrankung (Periarteriitis nodosa), die mit Morbus Brightii und einer rapid fortschreitenden allgemeinen Muskellähmung einhergeht.," in *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* 1, 484.
- König, H E, and H-G Liebich (2004), *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis; Ausgabe in einem Band*, Schattauer, 103–18.
- Laemmli, U K (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, 227(5259), 680–85.
- Lahl, K, C Loddenkemper, C Drouin, J Freyer, J Arnason, G Eberl, A Hamann, H Wagner, J Huehn, and T Sparwasser (2007), "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.," *The Journal of Experimental Medicine*, 204(1), 57–63.
- Lan, H Y, D J Nikolic-Paterson, and R C Atkins (1992), "Involvement of activated periglomerular leukocytes in the rupture of Bowman's capsule and glomerular crescent progression in experimental glomerulonephritis.," *Laboratory Investigation*, 67(6), 743–51.
- Lazzeri, E, C Crescioli, E Ronconi, B Mazzinghi, C Sagrinati, G S Netti, M L Angelotti, E Parente, L Ballerini, L Cosmi, L Maggi, L Gesualdo, M Rotondi, F Annunziato, E Maggi, L Lasagni, M Serio, S Romagnani, G B Vannelli, and P Romagnani (2007), "Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(12), 3128–38.
- Lee, F, R Mulligan, P Berg, and G Ringold (1981), "Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids.," *Nature*, 294(5838), 228–32.
- Levey, AS, T Greene, MD Schluchter, PA Cleary, PE Teschan, RA Lorenz, ME Molitch, WE Mitch, C Siebert, and PM Hall (1993), "Glomerular filtration rate measurements in

- clinical trials. Modification of diet in renal disease study group and the diabetes control and complications trial research group," *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(5), 1159–71.
- Levinsky, R J, J S Cameron, and J F Soothill (1977), "Serum immune complexes and disease activity in lupus nephritis.," *Lancet*, 1(8011), 564–67.
- Li, R-M, M H Branton, S Tanawattanacharoen, R A Falk, J C Jennette, and J B Kopp (2002), "Molecular identification of SV40 infection in human subjects and possible association with kidney disease.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(9), 2320–30.
- Li, Y, P Lee, E S Sobel, S Narain, M Satoh, M S Segal, W H Reeves, and H B Richards (2009), "Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus.," *Arthritis Research & Therapy*, 11(1), R6.
- Lis, J T, J A Simon, and C A Sutton (1983), "New heat shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene.," *Cell*, 35(2 Pt 1), 403–10.
- Lorenz, J N, H Weihprecht, J Schnermann, O Skøtt, and J P Briggs (1991), "Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport.," *The American Journal of Physiology*, 260(4 Pt 2), 486–93.
- Lostrom, M E., M R. Stone, M Tam, W.N Burnette, A Pinter, and R C. Nowinski (1979), "Monoclonal antibodies against murine leukemia viruses: Identification of six antigenic determinants on the p15(E) and gp70 envelope proteins," *Virology*, 98(2), 336–50.
- Macary, G, J Rossert, P Bruneval, C Mandet, M-F Bélair, P Houillier, and J-P Duong Van Huyen (2010), "Transgenic mice expressing nitroreductase gene under the control of the podocin promoter: a new murine model of inductible glomerular injury.," *Virchows Archiv*, 456(3), 325–37.
- Mack, A, B Sauer, K Abremski, and R Hoess (1992), "Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site.," *Nucleic Acids Research*, 20(17), 4451–55.
- Madsen, K M, S Nielsen, and C. C Tisher (2008), "Chapter 2, Anatomy of the Kidney," in *Brenners and Rectors The Kidney*, 27–37.
- Magil, A B (1985), "Histogenesis of glomerular crescents. Immunohistochemical demonstration of cytokeratin in crescent cells.," *The American Journal of Pathology*, 120(2), 222–29.
- Markowitz, G S, G B Appel, P L Fine, A Z Fenves, N R Loon, S Jagannath, J A Kuhn, A D Dratch, and V D D'Agati (2001), "Collapsing focal segmental glomerulosclerosis

- following treatment with high-dose pamidronate.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(6), 1164–72.
- Markowitz, G S, S H Nasr, M B Stokes, and V D D'Agati (2010), "Treatment with IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  is associated with collapsing focal segmental glomerulosclerosis.," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(4), 607–15.
- Matsusaka, T, J Xin, S Niwa, K Kobayashi, A Akatsuka, H Hashizume, Q-C Wang, I Pastan, A B Fogo, and I Ichikawa (2005), "Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4), 1013–23.
- Maxwell, F, I H Maxwell, and L M Glode (1987), "Cloning, sequence determination, and expression in transfected cells of the coding sequence for the tox 176 attenuated diphtheria toxin A chain.," *Molecular and Cellular Biology*, 7(4), 1576–79.
- Mayo, K E, R Warren, and R D Palmiter (1982), "The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells.," *Cell*, 29(1), 99–108.
- McCarthy, El T, M Sharma, and V J Savin (2010), "Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis.," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(11), 2115–21.
- Metzger, D, and P Chambon (2001), "Site- and time-specific gene targeting in the mouse.," *Methods*, 24(1), 71–80.
- Mitamura, T, S Higashiyama, N Taniguchi, M Klagsbrun, and E Mekada (1995), "Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity.," *The Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1015–19.
- Miyake, Y, H Kaise, K-I Isono, H Koseki, K Kohno, and M Tanaka (2007), "Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II cells.," *Journal of Immunology*, 178(8), 5001–9.
- Moeller, M. J. (2004), "Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(1), 61–67.
- Moon, K C, S Y Park, H W Kim, H K Hong, and H S Lee (2002), "Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human crescentic glomerulonephritis.," *Histopathology*, 41(2), 158–65.
- Morin, J G, and J W Hastings (1971), "Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates.," *Journal of Cellular Physiology*, 77(3), 305–12.

- Mortensen, E S, and O P Rekvig (2009), "Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(4), 696–704.
- Mostoslavsky, G, R Fischel, N Yachimovich, Y Yarkoni, E Rosenmann, M Monestier, M Baniyash, and D Eilat (2001), "Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry.," *European Journal of Immunology*, 31(4), 1221–27.
- Moudgil, A, C C Nast, A Bagga, L Wei, A Nurmamet, A H Cohen, S C Jordan, and M Toyoda (2001), "Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy.," *Kidney International*, 59(6), 2126–33.
- Nagata, M, Y Yamaguchi, and K Ito (1993), "Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys.," *Anatomy and Embryology*, 187(3), 275–79.
- Nagata, M, and W Kriz (1992), "Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis.," *Kidney International*, 42(1), 148–60.
- Naglich, J G, J E Metherall, D W Russell, and L Eidels (1992), "Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor.," *Cell*, 69(6), 1051–61.
- Neal, C R, H Crook, E Bell, S J Harper, and D O Bates (2005), "Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(5), 1223–35.
- Netzer, K O, A Leinonen, A Boutaud, D B Borza, P Todd, S Gunwar, J P Langeveld, and B G Hudson (1999), "The goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain.," *The Journal of Biological Chemistry*, 274(16), 11267–74.
- Ng, Y Y, J M Fan, W Mu, D J Nikolic-Paterson, W C Yang, T P Huang, R C Atkins, and H Y Lan (1999), "Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 14(12), 2860–72.
- Nicholas, S B, J M Basgen, and S Sinha (2011), "Using stereologic techniques for podocyte counting in the mouse: shifting the paradigm.," *American Journal of Nephrology*, 33 Suppl 1, 1–7.
- Ohse, T, A M Chang, J W Pippin, G Jarad, K L Hudkins, C E Alpers, J H Miner, and S J Shankland (2009), "A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier.," *American Journal of Physiology*, 297(6), F1566–74.

- Ohse, T, JW Pippin, A M Chang, R D Krofft, J H Miner, R Vaughan, and S J Shankland (2009), "The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review.," *Kidney International*, 76(12), 1225–38.
- Olivetti, G, P Anversa, W Rigamonti, L Vitali-Mazza, and A V Loud (1977), "Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study.," *The Journal of Cell Biology*, 75(2 Pt 1), 573–85.
- Ophascharoensuk, V, J W Pippin, K L Gordon, S J Shankland, W G Couser, and R J Johnson (1998), "Role of intrinsic renal cells versus infiltrating cells in glomerular crescent formation.," *Kidney International*, 54(2), 416–25.
- Orban, P C, D Chui, and J D Marth (1992), "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6861–65.
- Ozcan, A, S S Shen, C Hamilton, K Anjana, D Coffey, B Krishnan, and L D Truong (2011), "PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study.," *Modern Pathology*, 24(6), 751–64.
- Pabst, R, and R B Sterzel (1983), "Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis.," *Kidney International*, 24(5), 626–31.
- Pappenheimer, A M (1977), "Diphtheria toxin.," *Annual Review of Biochemistry*, 46, 69–94.
- Pedchenko, V, O Bondar, A B Fogo, R Vanacore, P Voziyan, A R Kitching, J Wieslander, Cl Kashtan, D-B Borza, E G Neilson, C B Wilson, and B G Hudson (2010), "Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis.," *The New England Journal of Medicine*, 363(4), 343–54.
- Pera, F, P Mattias, and K Detzer (1977), "Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine.," *Cell and Tissue Kinetics*, 10(3), 255–64.
- Peti-Peterdi, J, R Chambrey, Z Bebok, D Biemesderfer, P L St John, D R Abrahamson, D G Warnock, and P D Bell (2000), "Macula densa Na(+)/H(+) exchange activities mediated by apical NHE2 and basolateral NHE4 isoforms.," *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 278(3), 452–63.
- Peti-Peterdi, J, and R C Harris (2010), "Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(7), 1093–96.
- Pusey, C D (2003), "Anti-glomerular basement membrane disease.," *Kidney International*, 64(4), 1535–50.

- Putaala, H, R Soinen, P Kilpeläinen, J Wartiovaara, and K Tryggvason (2001), "The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death.," *Human Molecular Genetics*, 10(1), 1–8.
- Raats, C J, J van den Born, M A Bakker, B Oppers-Walgreen, B J Pisa, H B Dijkman, K J Assmann, and J H Berden (2000), "Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies.," *The American Journal of Pathology*, 156(5), 1749–65.
- Radic, M, T Marion, and M Monestier (2004), "Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis.," *Journal of Immunology*, 172(11), 6692–6700.
- Rahman, A, and D A Isenberg (2008), "Systemic lupus erythematosus.," *The New England Journal of Medicine*, 358(9), 929–39.
- Ramos-Vara, J A (2005), "Technical aspects of immunohistochemistry.," *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–26.
- Rehberg, P B (1926), "Studies on kidney function: The rate of filtration and reabsorption in the human kidney.," *The Biochemical Journal*, 20(3), 447–60.
- Reiser, J, and S Sever (2013), "Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease.," *Annual Review of Medicine*, 64, 357–66.
- Renneke, H G, Y Patel, and M A Venkatachalam (1978), "Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat.," *Kidney international*, 13(4), 278–88.
- Renneke, H G, and P S Klein (1989), "Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis.," *American Journal of Kidney Diseases*, 13(6), 443–56.
- Reynolds, J, V A Norgan, U Bhambra, J Smith, H T Cook, and C D Pusey (2002), "Anti-CD8 monoclonal antibody therapy is effective in the prevention and treatment of experimental autoimmune glomerulonephritis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(2), 359–69.
- Rocha, A S, J P Kokko, and M B Burg (1999), "Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle: evidence for active chloride transport 1973.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(5), 1145–56.
- van Roeyen, C R C, F Eitner, P Boor, M J Moeller, U Raffetseder, L Hanssen, E Bücher, L Villa, M C Banas, K L Hudkins, C E Alpers, T Ostendorf, and J Floege (2011), "Induction of progressive glomerulonephritis by podocyte-specific overexpression of platelet-derived growth factor-D.," *Kidney International*, 80(12), 1292–1305.

- Roman, R J, P K Carmines, R Loutzenhiser, and J D Conger (1991), "Direct studies on the control of the renal microcirculation.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 2(2), 136–49.
- Ronco, P (2007), "Proteinuria: is it all in the foot?," *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2079–82.
- Ronconi, E, C Sagrinati, M L Angelotti, E Lazzeri, B Mazzinghi, L Ballerini, E Parente, F Becherucci, M Gacci, M Carini, E Maggi, M Serio, G B Vannelli, L Lasagni, S Romagnani, and P Romagnani (2009), "Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 322–32.
- Roselli, S, O Gribouval, N Boute, M Sich, F Benessy, T Attié, M-C Gubler, and C Antignac (2002), "Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area.," *The American Journal of Pathology*, 160(1), 131–39.
- Rossant, J., and A. McMahon (1999), "'Cre'-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics," *Genes & Development*, 13(2), 142–45.
- Saam, J R, and J I Gordon (1999), "Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium.," *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 38071–82.
- Saiki, R K, D H Gelfand, S Stoffel, S J Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, and H A Erlich (1988), "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.," *Science*, 239(4839), 487–91.
- Saiki, R K, S Scharf, F Faloona, K B Mullis, G T Horn, H A Erlich, and N Arnheim (1985), "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.," *Science*, 230(4732), 1350–54.
- Sandvig, K, and S Olsnes (1981), "Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. Characterization of the entry process and effects of low pH on the toxin molecule.," *The Journal of Biological Chemistry*, 256(17), 9068–76.
- Santín, S, G Bullich, B Tazón-Vega, R García-Maset, I Giménez, I Silva, P Ruíz, J Ballarín, R Torra, and E Ars (2011), "Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome.," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(5), 1139–48.
- Sauer, B (1993), "Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase.," *Methods in Enzymology*, 225, 890–900.
- Sauer, B, and N Henderson (1988), "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), 5166–70.

- Schnabel, E, J M Anderson, and M G Farquhar (1990), "The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium.," *The Journal of Cell Biology*, 111(3), 1255–63.
- Schnermann, J, and J P Briggs (2008), "Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice.," *Kidney International*, 74(4), 418–26.
- Schwarz, K, M Simons, J Reiser, M A Saleem, C Faul, W Kriz, A S Shaw, L B Holzman, and P Mundel (2001), "Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin.," *The Journal of Clinical Investigation*, 108(11), 1621–29.
- Schägger, H, H Aquila, and G Von Jagow (1988), "Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis.," *Analytical Biochemistry*, 173(1), 201–5.
- Schönenberger, E, J H Ehrich, H Haller, and M Schiffer (2011), "The podocyte as a direct target of immunosuppressive agents.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26(1), 18–24.
- Schönig, K, F Schwenk, K Rajewsky, and H Bujard (2002), "Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo.," *Nucleic Acids Research*, 30(23), 134.
- Scindia, Y M, U S Deshmukh, and H Bagavant (2010), "Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention.," *Advanced drug delivery reviews*, 62(14), 1337–43.
- Seidowsky, A, M Hoffmann, S Ruben-Duval, R Mesbah, E Masy, X Kyndt, B Maouad, S Billion, L H Noël, P Vanhille, and P Bataille (2007), "Elastase-ANCA-associated idiopathic necrotizing crescentic glomerulonephritis--a report of three cases.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 22(7), 2068–71.
- Shih, N Y, J Li, R Cotran, P Mundel, J H Miner, and A S Shaw (2001), "CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain.," *The American Journal of Pathology*, 159(6), 2303–8.
- Singh, M B, and R B Knox (1984), "Quantitative cytochemistry of beta-galactosidase in normal and enzyme deficient (gal) pollen of *Brassica campestris*: application of the indigogenic method.," *The Histochemical Journal*, 16(12), 1273–96.
- Singh, S K S, M Jeansson, and S E Quaggin (2011), "New insights into the pathogenesis of cellular crescents.," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(3), 258–62.
- Sinn, H. P. (Pathologisches Institut des Universitätsklinikums Heidelberg) (n.d.), "electronic learning - Bildergalerie Organpathologie Urogenitaltrakt," <<http://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/bilder/?c=urogenitaltrakt>> (Apr. 30, 2012).

- Smeets, B, M L Angelotti, P Rizzo, H Dijkman, E Lazzeri, F Mooren, L Ballerini, E Parente, C Sagrinati, B Mazzinghi, E Ronconi, F Becherucci, A Benigni, E Steenbergen, L Lasagni, G Remuzzi, J Wetzels, and P Romagnani (2009), "Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12), 2593–2603.
- Smeets, B, H B P M Dijkman, N A J M te Loeke, J P H F van Son, E J Steenbergen, K J M Assmann, J F M Wetzels, and P J T A Groenen (2003), "Podocyte changes upon induction of albuminuria in Thy-1.1 transgenic mice.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 18(12), 2524–33.
- Smeets, B, H B P M Dijkman, J F M Wetzels, and E J Steenbergen (2006), "Lessons from studies on focal segmental glomerulosclerosis: an important role for parietal epithelial cells?," *The Journal of Pathology*, 210(3), 263–72.
- Smeets, B, C Kuppe, E-M Sicking, A Fuss, P Jirak, T H van Kuppevelt, Karlhans Endlich, J F M Wetzels, H-J Gröne, J Floege, and M J Moeller (2011), "Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(7), 1262–74.
- Smeets, B, S Uhlig, A Fuss, F Mooren, J F M Wetzels, J Floege, and M J Moeller (2009), "Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12), 2604–15.
- Smith, H W (1953), "Comparative physiology of the kidney.," *Journal of the American Medical Association*, 153(17), 1512–14.
- Soriano, P (1999), "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.," *Nature Genetics*, 21(1), 70–71.
- Sraer, J D, C Adida, M N Peraldi, E Rondeau, and A Kanfer (1993), "Species-specific properties of the glomerular mesangium.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 3(7), 1342–50.
- Stanis, Jim (2007), "Medical Visual," <http://streetanatomy.com/2007/06/16/interlude-medical-visual-9/> (Apr. 30, 2012).
- Sternberg, N, D Hamilton, and R Hoess (1981), "Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome.," *Journal of Molecular Biology*, 150(4), 487–507.
- Stevens, L A, and A S Levey (2009), "Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(11), 2305–13.
- Stockand, J D, and S C Sansom (1998), "Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction.," *Physiological Reviews*, 78(3), 723–44.

- Stokes, M B, G S Markowitz, J Lin, A M Valeri, and V D D'Agati (2004), "Glomerular tip lesion: a distinct entity within the minimal change disease/focal segmental glomerulosclerosis spectrum.," *Kidney International*, 65(5), 1690–1702.
- Stokes, M B, A M Valeri, G S Markowitz, and V D D'Agati (2006), "Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features.," *Kidney International*, 70(10), 1783–92.
- Strauss, N (1960), "The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa Cell: II. Effect on nucleic acid metabolism.," *The Journal of Experimental Medicine*, 112(2), 351–59.
- Strauss, N, and E D Hendee (1959), "The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells.," *The Journal of Experimental Medicine*, 109(2), 145–63.
- Striker, L J, T Doi, S Elliot, and G E Striker (1989), "The contribution of glomerular mesangial cells to progressive glomerulosclerosis.," *Seminars in Nephrology*, 9(4), 318–28.
- Tervaert, J W, F J van der Woude, A S Fauci, J L Ambrus, J Velosa, W F Keane, S Meijer, M van der Giessen, G K van der Hem, and T H The (1989), "Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies.," *Archives of Internal Medicine*, 149(11), 2461–65.
- Thomas, D B, N Franceschini, S L Hogan, S Ten Holder, C E Jennette, R J Falk, and J C Jennette (2006), "Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants.," *Kidney International*, 69(5), 920–26.
- Thurau, K., and J. Schnermann (1965), "Die Natriumkonzentration an den Macula densa-Zellen als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat (Mikropunktionsversuche).," *Klinische Wochenschrift*, 43(8), 410–13.
- Todd, R B, and Sir W Bowman (1857), *The Physiological anatomy and physiology of man* (Google eBook), Blanchard and Lea, 926.
- Tomlinson, L, Y Boriskin, I McPhee, S Holwill, and P Rice (2003), "Acute cytomegalovirus infection complicated by collapsing glomerulopathy.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 18(1), 187–89.
- Toong, C, S Adelstein, and T G Phan (2011), "Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis.," *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 4, 17–28.
- Topham, P S, H Kawachi, S A Haydar, S Chugh, T A Addona, K B Charron, L B Holzman, M Shia, F Shimizu, and D J Salant (1999), "Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin.," *The Journal of Clinical Investigation*, 104(11), 1559–66.

- Troyanov, S, C A Wall, J A Miller, J W Scholey, and D C Cattran (2005), "Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4), 1061–68.
- Tryggvason, K, and J Wartiovaara (2001), "Molecular basis of glomerular permselectivity.," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10(4), 543–49.
- Tumbar, T, G Guasch, V Greco, C Blanpain, W E Lowry, M Rendl, and E Fuchs (2008), "Defining the epithelial stem cell niche in skin," *Science*, 303(5656), 359–63.
- Urlinger, S, U Baron, M Thellmann, M T Hasan, H Bujard, and W Hillen (2000), "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 7963–68.
- Vallon, V, J Schroth, J Satriano, R C Blantz, S C Thomson and T Rieg (2009), "Adenosine A<sub>1</sub> receptors determine glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early streptozotocin diabetes mellitus.," *Nephron Physiology*, 11, 30–38.
- Vanrenterghem, Y, R Vanholder, M Lammens-Verslijpe, and P P Lambert (1980), "Sieving studies in 'urea-induced nephropathy' in the dog.," *Clinical Science*, 58(1), 65–75.
- Webber, W A, and J Blackbourn (1971), "The permeability of the parietal layer of Bowman's capsule.," *Laboratory Investigation*, 25(5), 367–73.
- Wei, C, S El Hindi, J Li, A Fornoni, N Goes, J Sageshima, D Maignel, S A Karumanchi, H-K Yap, M Saleem, Q Zhang, B Nikolic, A Chaudhuri, P Daftarian, E Salido, A Torres, M Salifu, M M Sarwal, F Schaefer, C Morath, V Schwenger, M Zeier, V Gupta, D Roth, M P Rastaldi, G Burke, P Ruiz, and J Reiser (2011), "Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis.," *Nature Medicine*, 17(8), 952–60.
- de Wet, J R, K V Wood, D R Helinski, and M DeLuca (1985), "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 7870–73.
- Weyer, K, T Storm, J Shan, S Vainio, R Kozyraki, P J Verroust, E I Christensen, and R Nielsen (2011), "Mouse model of proximal tubule endocytic dysfunction.," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26(11), 3446–51.
- Wharram, B L, M Goyal, J E Wiggins, S K Sanden, S Hussain, W E Filipiak, T L Saunders, R C Dysko, K Kohno, L B Holzman, and R C Wiggins (2005), "Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(10), 2941–52.

- Wood, K V (1995), "Marker proteins for gene expression.," *Current Opinion in Biotechnology*, 6(1), 50–58.
- Woodworth, T G, J G Abuelo, H A Austin, and A Esparza (1987), "Severe glomerulonephritis with late emergence of classic Wegener's granulomatosis. Report of 4 cases and review of the literature.," *Medicine*, 66(3), 181–91.
- Woywodt, A, M Haubitz, H Haller, and E L Matteson (2006), "Wegener's granulomatosis.," *Lancet*, 367(9519), 1362–66.
- Wu, J, J Hicks, J Borillo, W F Glass, and Y-H Lou (2002), "CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis.," *The Journal of Clinical Investigation*, 109(4), 517–24.
- Wu, S, Y Wu, and M R Capecchi (2006), "Motoneurons and oligodendrocytes are sequentially generated from neural stem cells but do not appear to share common lineage-restricted progenitors in vivo.," *Development*, 133(4), 581–90.
- Wyatt, C M, P E Klotman, and V D D'Agati (2008), "HIV-associated nephropathy: clinical presentation, pathology, and epidemiology in the era of antiretroviral therapy.," *Seminars in Nephrology*, 28(6), 513–22.
- Xiao, H, P Heeringa, P Hu, Z Liu, M Zhao, Y Aratani, N Maeda, R J Falk, and J C Jennette (2002), "Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice.," *The Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 955–63.
- Yamaguchi, A, T Udagawa, and T Sawai (1990), "Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein.," *The Journal of Biological Chemistry*, 265(9), 4809–13.
- Yamaizumi, M, E Mekada, T Uchida, and Y Okada (1978), "One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell.," *Cell*, 15(1), 245–50.
- Yang, R, Z Cui, J Zhao, and M-H Zhao (2009), "The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility of Chinese patients with anti-GBM disease.," *Clinical Immunology*, 133(2), 245–50.
- Yang, T, J M Park, L Arend, Y Huang, R Topaloglu, A Pasumarthy, H Praetorius, K Spring, J P Briggs, and J Schnermann (2000), "Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line.," *The Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37922–29.
- Yao, F, T Svensjö, T Winkler, M Lu, C Eriksson, and E Eriksson (1998), "Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells.," *Human Gene Therapy*, 9(13), 1939–50.

- Yokoi, H, M Mukoyama, A Sugawara, K Mori, T Nagae, H Makino, T Suganami, K Yahata, Y Fujinaga, I Tanaka, and K Nakao (2002), "Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis.," *American Journal of Physiology.*, 282(5), F933–42.
- Zhou, X-J, J-C Lv, M-H Zhao, and H Zhang (2010), "Advances in the genetics of anti-glomerular basement membrane disease.," *American Journal of Nephrology*, 32(5), 482–90.
- Zhu, Z, T Zheng, C G Lee, R J Homer, and J A Elias (2002), "Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling.," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 13(2), 121–28.
- Zou, J, E Yaoita, Y Watanabe, Y Yoshida, M Nameta, H Li, Z Qu, and T Yamamoto (2006), "Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury.," *Virchows Archiv*, 448(4), 485–92.

## 11 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

### 11.1 PAPER

Sicking, Eva-Maria, Astrid Fuss, Sandra Uhlig, Peggy Jirak, Henry Dijkman, Jack Wetzels, Daniel R Engel, Torsten Urzyncok, Stefan Heidenreich, Wilhelm Kriz, Christian Kurts, Tammo Ostendorf, Jürgen Floege, Bart Smeets, and Marcus J Moeller (2012), "Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(4), 629–40.

Smeets, Bart, Christoph Kuppe, Eva-Maria Sicking, Astrid Fuss, Peggy Jirak, Toin H van Kuppevelt, Karlhans Endlich, Jack F M Wetzels, Hermann-Josef Gröne, Jürgen Floege, and Marcus J Moeller (2011), "Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis.," *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(7), 1262–74.

Tenten, Verena , Menzel Sylvia, Kunter Uta, Sicking Eva-Maria, van Roeyen Claudia, Sanden Silja, Kaldenbach Michaela, Boor Peter, Fuss Astrid, Uhlig Sandra, Lanzmich Regina, Willemsen B, Dijkman H, Grepl M, Wild K, Kriz Wilhelm, Smeets Bart, Floege Jürgen, Moeller Marcus Johannes. "Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis". *Am Soc Nephrol*. 2013 Aug 22. [Epub ahead of print)

### 11.2 FREIE VORTRÄGE

„Induktion einer Halbmondnephritis durch subtotale transgene Ablation von Parietalzellen“

Eva-Maria Sicking, Astrid Fuss, Sandra Uhlig, Peggy Jirak, Henry Dijkman, Jack Wetzels, Daniel R Engel, Torsten Urzyncok, Stefan Heidenreich, Wilhelm Kriz, Christian Kurts, Tammo Ostendorf, Jürgen Floege, Bart Smeets, Marcus J Moeller.

Im Rahmen der 3. Jahrestagung der DGfN, 10-13.09.2011, Berlin

„Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation“

Eva-Maria Sicking, Astrid Fuss, Sandra Uhlig, Peggy Jirak, Henry Dijkman, Jack Wetzels, Daniel R Engel, Torsten Urzyncok, Stefan Heidenreich, Wilhelm Kriz, Christian Kurts, Tammo Ostendorf, Jürgen Floege, Bart Smeets, Marcus J Moeller

ERCSG2012 - 24th Annual Meeting of the European Renal Cell Study Group, March 22-25, 2012 Arnheim-Doorwerth-the Netherlands

### 11.3 POSTER

„Akute Läsionen im Glomerulum der Niere – Ablation parietaler Epithelzellen“

Sicking, Eva-Maria, Astrid Fuss, Peggy Jirak, Bart Smeets, Wilhelm Kriz, Jürgen Floege, Marcus J Moeller

2. Tag der Medizinischen Forschung, IZKF Aachen, 26.11.2010

## 12 ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## 13 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die das Anfertigen dieser Dissertation möglich gemacht haben.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Marcus J. Moeller für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie für seine Unterstützung und die engagierte Betreuung meiner Forschungsarbeit. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die spontane Zusage, die freundliche Betreuung sowie die sorgfältige Korrektur dieser externen Dissertation. Desweiteren bedanke ich mich bei allen Kooperationspartnern, die an der Entstehung dieser Dissertation beteiligt waren: Prof. Stefan Heidenreich, Prof. Wilhelm Kriz, Dr. Henry Dijkman, Prof. Christian Kurts und dem Labor der Versuchstierkunde des Uniklinikums Aachen.

### **DANKE**

meinen Eltern Konrad und Elisabeth und meiner Schwester Katharina, dafür, dass sie meine Familie sind.

den drei Freundinnen, die mit mir Abitur, Studium und Dissertation überstanden haben und hoffentlich noch lange mein Leben begleiten: Sarah, Jennifer und Kathrin.

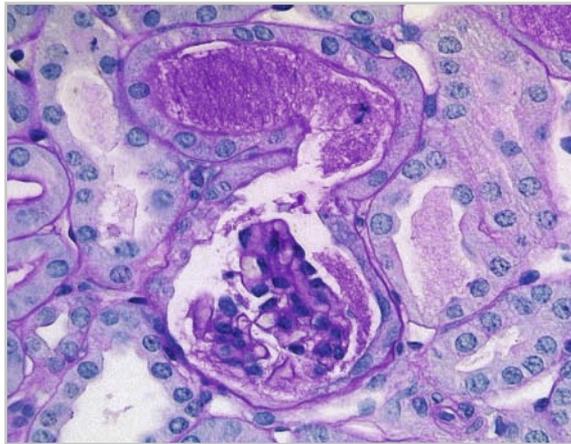
meiner Freundin Lisa, die das komplette Studium mit mir bestritten hat und mich trotzdem noch mag, und dir, liebe Luisa, für viele „Lernabende“ mit Karteikarten, Wein und Käse.

meiner ehemaligen WG – Rebekka und Christina - für Motivation und offene Ohren.

all meinen Kollegen der „AG-Moeller“: Danke an dich, lieber Bart, für deinen fachlichen Rat und deinen Humor. Verena, danke für deine geduldigen Antworten auf meine Anfängerfragen, für zahlreiche gemeinsame Pausen und so vieles mehr. Danke an Peggy, Sandra, Do und Astrid für eure Mithilfe bei meinem Projekt und das immer offene Ohr für Doktorandenprobleme. Dir, Christoph, danke ich für deine ansteckende Begeisterung für die Nephrologie. Danke Nazanin für die erste Glomisolation meines Lebens. Kevin, dir danke ich für deine Ehrlichkeit. Fürs Korrekturlesen meines Papers und fachliche Diskussionen bedanke ich mich bei Sylvie. Danke an Katja, für die

Einführung in diverse OP-Techniken und lustige Musikexkurse und dir Susanne danke ich dafür, dass du mich nach Berlin begleitet hast.

Ja und ganz zum Schluß danke ich dem wichtigsten Menschen: dir, lieber Christoph. Für so vieles muss ich danke sagen. Dafür, dass du immer Verständnis hast, dafür, dass du bis spät in die Nacht Computerprobleme behebst, dafür, dass du meine lustigere Hälfte bist... Danke für alles! Ohne dich hätte es diese Arbeit nicht gegeben.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6201-9



9 783835 196201 9